

Université de Montréal

**Développement, caractérisation et évaluation *in vivo* par
implantation périvasculaire de microparticules pour
inhiber l'hyperplasie néo-intimale des carotides de rat**

par

Daniel Leyni-Barbaz

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D)
en Sciences Pharmaceutiques
option Technologie Pharmaceutique

Septembre 2004

© Daniel Leyni-Barbaz, 2004



QV

705

U58

2004

V.011

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Développement, caractérisation et évaluation *in vivo* par
implantation périvasculaire de microparticules
pour inhiber l'hyperplasie néo-intimale des carotides de rat

présentée par :

Daniel Leyni-Barbaz

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Suzanne Giasson, président-rapporteur

Dr. Jean Norbert McMullen, directeur de recherche

Dr. Emanuel Escher, co-directeur

Dr. Éric Thorin, membre du jury

Dr. Mircea Alexandru Mateescu, examinateur externe

Dr. Huy Ong, représentant du doyen de la FES

Résumé

Cette recherche consistait à développer et formuler des microsphères polymériques, par nébulisation, comme vecteurs pharmaceutiques pour évaluer l'inhibition de la prolifération néointimale après leur dépôt périvasculaire dans des carotides de rats, angioplastiées. Le L-158,809 et le Captopril étaient deux principes actifs. Les polymères étaient l'acide polylactique (PLA) et l'acide polyglycolique.

Les caractérisations *in vitro* des microsphères consistaient en l'évaluation de l'efficacité de la microencapsulation par spectrophotométrie, l'analyse granulomorphologique par microscopie électronique, par spectroscopie de corrélation de photons et par microscopie à force atomique (AFM), l'analyse thermique par thermogravimétrie à haute résolution (TGA-hr) et par analyse enthalpique différentielle (DSC), l'analyse chimique de la surface par spectroscopie Raman et l'évaluation de la libération des principes actifs par spectrophotométrie. L'AFM a permis d'avoir des topographies précises des surfaces et a révélé que les microsphères étaient sphériques, inférieures à trois microns avec une surface uniforme et lisse. Grâce à l'AFM, une nouvelle méthode d'analyse fractale, par la relation entre la taille d'une surface et son écart moyen arithmétique (RMS), a été appliquée aux microsphères pour évaluer la complexité de leur surface et déterminer leur dimension fractale de surface. Avec la TGA-hr, il était possible de quantifier des substances à condition qu'un composant majoritaire se dégrade après la substance d'intérêt. Par contre, lorsqu'il se dégrade avant, le dosage devient imprécis. Les DSC indiquaient que le L-158,809 et le Captopril étaient à l'état moléculaire au sein des microsphères. La spectroscopie Raman a pu être appliquée au contrôle de l'uniformité en principes actifs à la surface des microsphères.

Dans les caractérisations *in vivo des microsphères*, 20 % de L-158,809 microencapsulés dans du PLA 50-50 semblait, significativement à 0,05, rétablir la lumière et inhiber l'hyperplasie néointimale. Mais, aucun remodelage vasculaire n'a pu être détecté pour 10 % et 20 % de L-158,809. Avec la formulation PLA 60-40, des biais empêchaient de conclure à un rétablissement de la lumière, à une inhibition de l'hyperplasie néointimale et à un remodelage vasculaire, par 10 % et 20 % de L-158,809. Dans une bimédication (L-158,809 et Captopril), aucune potentialisation des effets pharmacologiques du L-158,809 par le Captopril n'a pu être détectée.

Mots-clés : Resténose cardiovasculaire, prolifération néointimale, microsphères, polymères, analyse fractale, dimension fractale de surface, microscopie à force atomique, spectroscopie Raman, thermogravimétrie, analyse enthalpique différentielle.

Abstract

The purpose of this study was to develop and formulate spray-dried polymeric microspheres as pharmaceutical vectors to inhibit neointimal proliferation by perivascular local deposition of poly(D,L-lactide) (PLA) microspheres containing an antihypertensive drug model (i.e. L-158,809 or Captopril), in the injured carotid artery of rats.

In vitro characterizations of microspheres were performed to evaluate the efficiency of microencapsulation using spectrophotometry, to evaluate the size and the morphology using scanning electron microscopy, photon correlation spectroscopy and atomic force microscopy (AFM), to evaluate thermal analysis using high resolution thermogravimetry (TGA-hr) and differential scanning calorimetry (DSC), and to evaluate chemical analysis using Raman spectroscopy and to evaluate the drug release kinetics. AFM photomicrographs represented precisely the surface topography indicating that microspheres had a spherical morphology, a size of about three microns and a smooth surface. With AFM technology, a new method of fractal analysis, using relationship between an area size and its root mean square (RMS), was performed to evaluate the complexity of surface of microspheres and determine her surface fractal dimension. By TGA-hr analysis, the quantification of drugs in polymeric microspheres could be performed providing that the thermal degradation temperature (TDT) of the drug is lower than that of the other constituents. In the case where a major component has a lower TDT the quantification is imprecise. DSC analysis indicated that L-158,809 and Captopril were in a molecular state, within the microsphere polymer matrix. Raman analysis demonstrated the potential of this technique for the control of the uniformity of drug at the surface of microspheres.

In vivo characterizations of microspheres showed a significant (5 %) inhibition of the neointimal hyperplasia with a recovery of the arterial lumen, by 20 % L-158,809 loaded PLA 50-50 microsphere formulation. No vascular remodeling was detected with a 10 % or 20 % L-158,809 loading. With the PLA 60-40 formulation, bias gave imprecisions in the results of the inhibition of neointimal proliferation and in the recovery of lumen, for a 10 %

or 20 % L-158,809 loading. No potentialization of pharmacological effects of L-158,809 by Captopril were detected with a bimedication strategy, using L-158,809 and Captopril loaded microspheres.

Keywords : Cardiovascular restenosis, neointimal proliferation, microspheres, polymers, fractal analysis, surface fractal dimension, atomic force microscopy, Raman spectroscopy, thermogravimetry, differential scanning calorimetry.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux	xviii
Liste des figures	xxii
Liste des annexes	xxxv
Liste des abréviations et des sigles.....	xxxvi
Dédicace	xxxix
Remerciements	xl
 INTRODUCTION	 1
 I REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	 3
I - 1 La problématique des maladies cardiovasculaires	3
I - 2 Athérosclérose	3
I - 2.1 Structure d'une artère normale.....	4
I - 2.2 Physiopathologie de la lésion athérosclérotique	5
I - 2.2.1 Stades de la lésion athérosclérotique.....	5
I - 2.3 Pathogenèse de l'athérosclérose : Athérogenèse.....	9
I - 2.3.1 Endothélium vasculaire	9
I - 2.3.1.1 Enzymes endothéliales	11
I - 2.3.1.1.1 Enzyme de conversion de l'angiotensine I	11

I - 6	Stratégies de traitement local de la resténose	43
I - 6.1	Administration endoluminale.....	44
I - 6.1.1	Recouvrements luminaux.....	45
I - 6.1.2	Cathéters à ballons	45
I - 6.1.3	Endoprothèses artérielles, polymériques et à enrobage polymérique	46
I - 6.1.4	Systèmes particuliers.....	48
I - 6.2	Administration périvasculaire	49
I - 6.2.1	Implants polymériques	50
I - 6.2.2	Systèmes polymériques particuliers	51
I - 7	Productions et caractérisations des vecteurs micro particuliers	52
I - 7.1	Concepts de base de la libération contrôlée	52
I - 7.1.1	Formes à libération contrôlée et classification des systèmes polymériques à libération contrôlée	53
I - 7.1.1.1	Systèmes réservoirs	53
I - 7.1.1.2	Systèmes matriciels	55
I - 7.1.2	Mécanismes de libération des principes actifs	56
I - 7.1.2.1	Systèmes réservoirs	59
I - 7.1.2.2	Systèmes matriciels	60
I - 7.2	Les microparticules	63
I - 7.3	La microencapsulation par nébulisation.....	65
I - 7.3.1	Polyglycolate et polylactate	67
I - 7.4	Caractérisations <i>in vitro</i> des microparticules	70
I - 7.4.1	Analyse géométrique.....	70
I - 7.4.1.1	Analyse de la taille	70
I - 7.4.1.1.1	Spectroscopie par corrélation de photon.....	71
I - 7.4.1.2	Analyse morphologique.....	72
I - 7.4.1.2.1	Microscopie à force atomique.....	72

I - 7.4.1.3	Analyse de la surface.....	78
I - 7.4.1.3.1	Analyse fractale et dimension fractale.....	79
I - 7.4.2	Caractérisation structurale interne par analyse thermique	85
I - 7.4.2.1	Analyse thermogravimétrique à haute résolution.....	86
I - 7.4.2.2	Analyse enthalpique différentielle.....	86
I - 7.4.3	Analyse chimique de la surface par spectroscopie Raman	89
II	OBJECTIFS	90
II - 1	Objectifs Généraux	90
II - 2	Objectifs spécifiques	90
II - 2.1	Objectifs spécifiques à la production des microsphères	91
II - 2.2	Objectifs spécifiques à la caractérisation des microsphères	91
II - 2.3	Objectifs spécifiques à l'application in vivo des microsphères	93
III	MATÉRIELS ET MÉTHODES	94
III - 1	Matériels	94
III - 1.1	Produits et animaux.....	94
III - 1.2	Appareils	95
III - 1.3	Animaux	96
III - 2	Méthodes	96
III - 2.1	Études in vitro	97
III - 2.1.1	Fabrication des microsphères.....	97
III - 2.1.2	Caractérisation des microsphères.....	98
III - 2.1.2.1	Évaluation de l'efficacité d'encapsulation	98
III - 2.1.2.2	Morphologie des microsphères.....	99

III - 2.1.2.2.1	Analyse par la microscopie électronique.....	99
III - 2.1.2.2.2	Analyse par la microscopie à force atomique.....	100
III - 2.1.2.2.2.1	<i>Analyse de la section des microsphères.....</i>	<i>101</i>
III - 2.1.2.2.2.2	<i>Analyse de la rugosité par l'analyse fractale</i>	<i>101</i>
III - 2.1.2.3	Analyse de la taille des microsphères.....	102
III - 2.1.2.4	Analyse thermique des microsphères	102
III - 2.1.2.4.1	Analyse enthalpique différentielle des microsphères.....	102
III - 2.1.2.4.2	Analyse thermogravimétrique à haute résolution des microsphères.....	103
III - 2.1.2.5	Analyse chimique de la surface des microsphères par la spectroscopie Raman	104
III - 2.1.2.6	Étude de libération in vitro	108
III - 2.2	Études in vivo.....	109
III - 2.2.1	Procédure d'angioplastie.....	109
III - 2.2.2	Administration des agents thérapeutiques.....	110
III - 2.2.2.1	Étude avec le L-158,809.....	110
III - 2.2.2.2	Étude de bi-médication avec L-158,809 et Captopril.....	111
III - 2.2.3	Réparation et analyse morphométriques des artères	111
III - 2.2.4	Analyse statistique	112

IV RÉSULTATS ET DISCUSSION 116

IV - 1 La production des microsphères..... 116

IV - 2 Caractérisations des microsphères *in vitro* 116

IV - 2.1 Évaluation de l'efficacité d'encapsulation par nébulisation 117

IV - 2.2 Analyse granulo-morphologique des microsphères 118

IV - 2.2.1 Analyse par microscopie électronique 118

IV - 2.2.2 Analyse par spectroscopie de corrélation de photons 122

IV - 2.2.3	Analyse par microscopie à force atomique	129
IV - 2.2.3.1	Analyse morphologique et topographique des microsphères.....	129
IV - 2.2.3.2	Analyse topographique des microsphères par évaluation de la phase	133
IV - 2.2.3.3	Application de l'AFM à une étude de stabilité des microsphères de PLA avec L-158,809	138
IV - 2.2.3.4	Analyse qualitative de la section par AFM des microsphères.....	143
IV - 2.2.3.5	Application de l'AFM à l'évaluation de la complexité de surface des microsphères par analyse fractale selon la méthode surface-RMS	146
IV - 2.3	Analyses thermiques	166
IV - 2.3.1	Analyse thermogravimétrique à haute résolution	166
IV - 2.3.2	Analyse enthalpique différentielle	180
IV - 2.3.2.1	Effets de la nébulisation sur le comportement thermique des polymères	180
IV - 2.3.2.2	Effets d'une trempe sur la transition vitreuse des microsphères de PLA.	191
IV - 2.3.2.3	Application de l'analyse enthalpique différentielle dans le contrôle de principes actifs microencapsulés dans du PLA.	199
IV - 2.4	Application de la spectroscopie Raman à la caractérisation chimique de la surface des microsphères.....	210
IV - 2.4.1	Caractérisations Raman des principes actifs.....	210
IV - 2.4.2	Caractérisations Raman des excipients.....	210
IV - 2.4.3	Application de la spectroscopie Raman dans l'évaluation de la présence de principes actifs à la surface de microsphères nébulisées.....	212

IV - 2.4.4	Application de la spectroscopie Raman à l'évaluation de l'uniformité en principes actifs à la surface des microsphères de PLA et PLGA nébulisées.	220
IV - 2.4.4.1	Détermination de la fiabilité des signaux Raman enregistrés.	221
IV - 2.4.4.2	Détermination des limites de détection et des limites de quantification des signaux.	223
IV - 2.4.4.3	Contrôle de l'uniformité en principes actifs à la surface des microsphères de PLA et de PLGA nébulisées.	224
IV - 2.4.5	Application potentielle de la spectroscopie Raman pour contrôler quantitativement la présence de principes actifs dans des microsphères de PLA et PLGA nébulisées.	229
IV - 2.5	Évaluation de la cinétique de libération, <i>in vitro</i> , de L-158,809 et de Captopril à partir de microsphères nébulisées de PLA, avec et sans PEG-1540 distéarate.	236
IV - 3	Application <i>in vivo</i> des microsphères dans des études d'évaluation de l'inhibition de la prolifération néo-intimale par le L-158,809 et le Captopril, à partir d'un modèle d'artère de rats.	243
IV - 3.1	Administration périvasculaire de L-158,809 microencapsulé dans des microsphères de PLA avec PEG-1540 distéarate.	243
IV - 3.1.1	Dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50, avec L-158,809.	244
IV - 3.1.1.1	Résultats statistiques de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces luminales normalisées, les proliférations néo-intimales normalisées et les rapports des surfaces normalisées des intimas sur médias, des différents groupes expérimentaux d'artères.	251

IV - 3.1.2	Dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 60-40, avec L-158,809.....	259
IV - 3.1.2.1	Résultats statistiques de l'analyse de variance à un caractère de classification sur les surfaces luminales normalisées, les proliférations néo-intimales normalisées et les rapports des surfaces normalisées des intimas sur médias des différents groupes expérimentaux d'artères.....	265
IV - 3.2	Étude de bi-médication par administration périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) avec L-158,809 et/ou Captopril.	272
IV - 3.2.1	Résultats statistiques de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces luminales normalisées, les proliférations néo-intimales normalisées et les rapports des surfaces normalisées des intimas sur médias des différents groupes expérimentaux d'artères.	278
IV - 3.3	Évaluations des coupes de carotides de rats dans les expériences <i>in vivo</i>	285
IV - 3.3.1	Évaluations des coupes de carotides de rats après dépôts périvasculaires de microsphères de PLA avec L-158,809	285
IV - 3.3.2	Évaluations qualitatives des coupes de carotides de rats dans l'étude sur la bimédication.....	289
V	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	293
VI	BIBLIOGRAPHIE.....	301
VII	ANNEXES.....	326

VII - 1 ANNEXE A	I
VII - 2 ANNEXE B	IV
VII - 3 ANNEXE C	VI
VII - 3.1 Spectre d'absorption du L-158,809 dans le THF	VI
VII - 3.2 Spectre d'absorption du Captopril dans le THF.....	VI
VII - 4 ANNEXE D	VII
VII - 4.1 Tailles moyennes des microsphères de PLA (49 898 PM) à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, déterminées à différents angles	VII
VII - 4.2 Tailles moyennes des microsphères de PLA (49 898 PM) avec PEG 1540 distéarate, à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, déterminées à différents angles.....	VIII
VII - 4.3 Tailles moyennes des microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG 1540 distéarate, à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, déterminées à différents angles	IX
VII - 4.4 Tailles moyennes des microsphères de différents PLA, avec ou sans PEG 1540 distéarate, déterminées à différents angles	X
VII - 4.5 Tailles moyennes de deux formulations de microsphères d'un mélange de PLA (73 405 PM) et PLA (15 075 PM), avec PEG 1540 distéarate, à des teneurs croissantes de L-158,809, déterminées à différents angles	XI
VII - 4.6 Tailles moyennes des microsphères de PLA (66 285 PM), avec 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril, déterminées à différents angles	XI
VII - 5 ANNEXE E	XII
VII - 5.1 Spectre Raman du L-158,809 et ses principaux pics	XII
VII - 5.2 Spectre Raman du Captopril et ses principaux pics	XIII

VII - 5.3 Spectre Raman du Dexamethasone et ses principaux pics.....	XIV
VII - 6 ANNEXE F	XV
VII - 6.1 Spectre Raman du PEG-1540 distéarate sans retrait de la fluorescence.....	XV
VII - 6.2 Spectre Raman du PEG-1540 distéarate avec retrait de la fluorescence	XVI
VII - 6.3 Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM et des microsphères de PLGA 48 000 PM, sans retrait de la fluorescence	XVII
VII - 6.4 Spectre Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec retrait de la fluorescence.....	XVIII
VII - 6.5 Spectre Raman des microsphères de PLGA 48 000 PM avec retrait de la fluorescence.....	XIX
VII - 7 ANNEXE G.....	XX
VII - 7.1 Comparaisons multiples des moyennes des surfaces luminale normalisées par le test de Scheffé	XX
VII - 7.2 Comparaisons multiples des moyennes des proliférations néo- intimales normalisées par le test de Scheffé	XXI
VII - 7.3 Comparaisons multiples des moyennes des rapports des surfaces normalisées des intimes (I) sur les médias (M) par le test de Scheffé	XXII
VII - 8 ANNEXE H.....	XXIII
VII - 8.1 Comparaisons multiples des moyennes des surfaces luminale normalisées par le test de Scheffé	XXIII
VII - 8.2 Comparaisons multiples des moyennes des proliférations néo- intimales normalisées par le test de Scheffé	XXIV
VII - 8.3 Comparaisons multiples des moyennes des rapports des surfaces normalisées des intimes (I) sur les médias (M) par le test de Scheffé	XXV
VII - 9 ANNEXE I	XXVI

VII - 9.1 Comparaisons multiples des moyennes des surfaces luminales normalisées par le test de Scheffé	XXVI
VII - 9.2 Comparaisons multiples des moyennes des proliférations néo- intimales normalisées par le test de Scheffé	XXVII
VII - 9.3 Comparaisons multiples des moyennes des rapports des surfaces normalisées des intimas (I) sur les médias (M) par le test de Scheffé	XXVIII

Liste des tableaux

Tableau I - 7.1-1	Valeurs de n et interprétation des mécanismes de libération diffusionnelle à partir des données de libération de médicament des films polymériques (Adaptée de Peppas, 1985 ^[222])	63
Tableau IV - 2.1-1	Teneur en L-158,809 dans différentes formulations de microsphères, nébulisées, de PLA et comparaison des rendements des microencapsulations.	117
Tableau IV - 2.3-1	Relation entre les paliers de dégradation thermique et les excipients présents dans des microsphères de PLA (95 248 PM) avec du PEG-1540 distéarate et selon différentes teneurs de Captopril (10 %, 20 %, 30 % et 40 %).	176
Tableau IV - 2.3-2	Résultats des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA avec des teneurs croissantes (10 %, 20 % 35 %) en L-158,809.	204
Tableau IV - 2.3-3	Résultats des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs de PLA sur L-158,809 égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 % , 10,71 % , 13,74 %) en PEG-1540 distéarate.	205
Tableau IV - 2.3-4	Résultats des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA avec des teneurs croissantes (10 %, 20 % 35 %) en Captopril.	207
Tableau IV - 2.4-1	Moyennes et coefficients de variation des ratios des surfaces des pics du L-158,809 sur PLA, à la même position sur les microsphères, contenant 5 % , 10 % , 20 % ou 35 % de L-158,809 (n = 6 pour chaque échantillon).	222
Tableau IV - 2.4-2	Limite de détection et limite de quantification du signal pour chaque ratios moyen des surfaces des pics normalement associés au L-158,809 sur ceux du PLGA. Les mesures sont faites sur des microsphères de PLA 49 898 PM, sans L-158,809 (n = 1).	223
Tableau IV - 2.4-3	Limite de détection et limite de quantification du signal pour chaque ratios moyen des surfaces des pics normalement associés au dexaméthasone sur ceux du PLGA. Les mesures sont faites sur des microsphères de PLGA RG504, sans dexaméthasone (n = 6).	224

Tableau IV - 2.4-4	Ratios des surfaces à des positions différentes sur les microsphères de PLA 49 898 PM contenant 5 %, 10 %, 20 % ou 35 % de L-158,809 (n = 6 pour chaque échantillon).....	226
Tableau IV - 2.4-5	Ratios des surfaces à des positions différentes sur les microsphères de PLA 49 898 PM avec L-158,809 et 3,84 %, 7,4 %, 10,71 % ou 13,79 % de PEG-1540 distéarate (n = 6 pour chaque échantillon).....	227
Tableau IV - 2.4-6	Ratios des surfaces à des positions différentes sur les microsphères de PLGA RG504 avec différentes teneurs de dexaméthasone.	228
Tableau IV - 3.1-1	Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.	252
Tableau IV - 3.1-2	Test de Levene dans l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.....	253
Tableau IV - 3.1-3	Comparaisons multiples des moyennes par le test de Scheffé appliqué sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.....	255
Tableau IV - 3.1-4	Puissance du test de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.....	258

Tableau IV - 3.1-5	Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.	266
Tableau IV - 3.1-6	Test de Levene dans l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.	267
Tableau IV - 3.1-7	Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.	269
Tableau IV - 3.1-8	Puissance du test de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.	271
Tableau IV - 3.2-1	Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.	279
Tableau IV - 3.2-2	Test de Levene dans l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 et/ou Captopril,	

microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.....280

Tableau IV - 3.2-3 Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.282

Tableau IV - 3.2-4 Puissance du test de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.284

Liste des figures

Figure I - 2.2-1	Schémas des sections des coupes d'artères des six premiers stades de la lésion athérosclérotique. (Tirée de Stary et coll., 1995 ^[6]).....	8
Figure I - 2.4-1	Recrutement des monocytes et leur transformation en macrophages spumeux (Tirée de Li et Glass, 2002) ^[57]	19
Figure I - 5.2-1	Effets physiologiques des récepteurs AT ₁ et AT ₂ de l'angiotensine II (Tirée de Berry et coll., 2001 ^[53]).....	39
Figure I - 5.2-2	Structure chimique du L-158,809 et du Captopril.....	40
Figure I - 7.1-1	Schéma de principe d'une section d'un système réservoir à diffusion contrôlée (Tirée de Ségot-Chicq et coll., 1985) ^[220]	54
Figure I - 7.1-2	Schéma de principe d'un système matriciel à diffusion contrôlée (Tirée de Ségot-Chicq et coll., 1985) ^[220]	55
Figure I - 7.3-1	Schéma du principe de fonctionnement du nébuliseur mini Spray Dryer BÜCHI B-191 (Figure 9A) et schéma de l'écoulement du produit et du gicleur de pulvérisation (Figure 9B). (Tirée du pamphlet publicitaire de la compagnie BÜCHI Laboratoriums-Technik AG ^[226] et du manuel d'utilisateur du Mini Spray Dryer BÜCHI 190 ^[227]).....	66
Figure I - 7.3-2	Polymérisation de l'acide poly-glycolique, de l'acide polylactique et de leurs copolymères. (Tirée et adaptée de Perrin et English, 1997 ^[228]).....	68
Figure I - 7.4-1	Courbe de la force inter-atomique en fonction de la distance. (Adaptée de Howland et Benatar, 1993-1996, ^[241] et de De Stefanis et Tomlinson, 2001 ^[242]).....	75
Figure I - 7.4-2	Schéma du mode contact intermittent ou mode Tapping™. (Tirée de Digital Instrument, 2000 ^[243]).....	77

Figure I - 7.4-3	Schéma de la Phase Imaging TM sur un échantillon comportant deux régions aux caractères visco-élastiques différents (Tirée de Babcock et Prater, 1995 ^[244]).	78
Figure III - 2.1-1	Distribution de l'erreur dans la mesure du bruit de fond, la limite de détection et la limite de quantification (Adaptée de Rubinson, J. F. et Rubinson, K. A., 1998 ^[271]).	107
Figure III - 2.2-1	Méthodes d'obtention des paramètres évalués dans les études in vivo	112
Figure IV - 2.2-1	Photomicrographie de microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 20 %).	119
Figure IV - 2.2-2	Photomicrographie de microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 10 %).	119
Figure IV - 2.2-3	Photomicrographie de microsphères d'un mélange de PLA (73 405 PM) et PLA (43 556 PM) (ratio respectif 50/50), avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 20 %).	120
Figure IV - 2.2-4	Photomicrographie de microsphères d'un mélange de PLA (73 405 PM) et PLA (43 556 PM) (ratio respectif 60/40), avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 20 %).	120
Figure IV - 2.2-5	Photomicrographie de microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate et Captopril (teneur 10 %).	121
Figure IV - 2.2-6	Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 10 % de L-158, 809, à différents angles.	123
Figure IV - 2.2-7	Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 20 % de L-158, 809, à différents angles (degré).	124
Figure IV - 2.2-8	Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 10 % de Captopril, à différents angles (degré).	125
Figure IV - 2.2-9	Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 20 % de Captopril, à différents angles (degré).	126

Figure IV - 2.2-10	Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 10 microns).....	130
Figure IV - 2.2-11	Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 8 microns).....	130
Figure IV - 2.2-12	Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM, composées de PEG-1540 distéarate, avec 20 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 10 microns).....	131
Figure IV - 2.2-13	Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM, composées de PEG-1540 distéarate, avec 20 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 4 microns).....	132
Figure IV - 2.2-14	Topographie par AFM de la surface d'une microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 – Présence de collapses (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 2 microns).....	132
Figure IV - 2.2-15	Image de phase par AFM des microsphères de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon une vue de dessus (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 8 microns).	133
Figure IV - 2.2-16	Images de phase par AFM des microsphères de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon deux vues de côté (rotation 30° et angle 45°) et selon deux échelles de phase (90° et 180°), (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 8 microns).....	134
Figure IV - 2.2-17	Topographie par AFM de la surface des microsphères de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon la même vue de dessus que celle présentée pour la phase (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 8 microns).....	135
Figure IV - 2.2-18	Image de phase par AFM de la surface d'une microsphère de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon une vue de dessus, présentant une dépression (collapse) à sa surface (Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 2 microns).	136
Figure IV - 2.2-19	Topographie par AFM de la surface d'une microsphère de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon la même vue de	

dessus que celle présentée pour la phase et présentant une dépression (collapse) à sa surface (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 2 microns)..... 137

- Figure IV - 2.2-20** Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809 – Âge des microsphères : 15 mois – Présence de cristaux à la surface (Tailles de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns (en haut) et 4 microns (en bas))...... 139
- Figure IV - 2.2-21** Image de phase par AFM des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809 – Âge des microsphères : 15 mois à 25°C – Présence de cristaux à la surface (Tailles de surface de numérisation, *scan sizes* : 8 microns (en haut) et 4 microns (en bas)). 140
- Figure IV - 2.2-22** Topographie par AFM des cristaux à la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809 – Âge des microsphères : 15 mois à 25°C – Caractéristiques considérées dans la photographie du haut : hauteur et illumination - Caractéristique considérée dans la photographie du bas : hauteur - (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 800 nanomètres). 142
- Figure IV - 2.2-23** Premier exemple d'analyse de section par AFM de microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM contenant 5 % de L-158,809 - (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 10 microns). 144
- Figure IV - 2.2-24** Deuxième exemple d'analyse de section par AFM de microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM contenant 5 % de L-158,809 - (Tailles de surface de numérisation, *scan size* : 4 et 10 microns). 145
- Figure IV - 2.2-25** Troisième exemple d'analyse de section par AFM de microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM contenant 5 % de L-158,809 - (Tailles de surface de numérisation, *scan size* : 4 et 10 microns). 146
- Figure IV - 2.2-26** Premier exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de la surface de numérisation, *scan size* : 8 microns. 148

- Figure IV - 2.2-27** Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-26 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 15 625 nm² à 93 8476,6 nm² ($\approx 0,93 \mu\text{m}^2$). Chaque point est une moyenne de 10 données. Taille de la surface de numérisation totale, *scan size* : 8 microns..... 149
- Figure IV - 2.2-28** Deuxième exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns. 150
- Figure IV - 2.2-29** Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-28 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 15 625 nm² à 93 8476,6 nm² ($\approx 0,93 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, *scan size* : 8 microns..... 151
- Figure IV - 2.2-30** Troisième exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale ; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns. 152
- Figure IV - 2.2-31** Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-30 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 15 625 nm² à 938 476,6 nm² ($\approx 0,93 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, *scan size* : 8 microns..... 153
- Figure IV - 2.2-32** Exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-

	158,809. Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 2 microns.	155
Figure IV - 2.2-33	Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-32 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm ²) – Étendue de l'échelle de surface : de 3 906,25 nm ² à 969 003,9 nm ² ($\approx 0,96 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Surface de numérisation totale, <i>scan size</i> : 2 microns.	156
Figure IV - 2.2-34	Exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 4 microns.	157
Figure IV - 2.2-35	Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-34 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm ²) – Étendue de l'échelle de surface : de 3 906,25 nm ² à 969 003,9 nm ² ($\approx 0,96 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, <i>scan size</i> : 4 microns.	158
Figure IV - 2.2-36	Exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 8 microns.	159
Figure IV - 2.2-37	Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-36 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm ²) – Étendue de l'échelle de surface : de 19 776,8 nm ² à 969 003,9 nm ² ($\approx 0,96 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation, <i>scan size</i> : 8 microns.	160
Figure IV - 2.2-38	Le Brocoli Romanesco. Un exemple d'auto-similarité à différentes échelles. (Tirée de Peitgen et coll., 1992) ^[248]	163

Figure IV - 2.2-39	Dimension fractale de surface de trois microsphères (de la même production) de PLA 95 248 PM avec PEG-1540 distéarate, contenant 20 % de L-158,809, ayant une surface avec ou sans collapse. Tracés du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm ²)- Étendue de l'échelle de surface : de 16 728,8 nm ² à 682 854,3 nm ² ($\approx 0,68 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, <i>scan size</i> : 3,68 microns.	164
Figure IV - 2.3-1	Thermogramme de TGA du PLA (95 248 PM).	167
Figure IV - 2.3-2	Thermogramme de TGA du PEG-1540 distéarate.	167
Figure IV - 2.3-3	Thermogramme de TGA du Captopril.	168
Figure IV - 2.3-4	Thermogramme de TGA du L-158,809.	169
Figure IV - 2.3-5	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM) seules.	170
Figure IV - 2.3-6	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM) (89 %) et PEG-1540 distéarate (11 %).	172
Figure IV - 2.3-7	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 10 %	173
Figure IV - 2.3-8	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 20 %	174
Figure IV - 2.3-9	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 30 %	174
Figure IV - 2.3-10	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 40 %	175
Figure IV - 2.3-11	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 10 %	177
Figure IV - 2.3-12	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 20 %	178
Figure IV - 2.3-13	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 30 %	178

Figure IV - 2.3-14	Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 40 %.....	179
Figure IV - 2.3-15	Thermogrammes de DSC montrant l'effet du processus de nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLA 95 248 PM.	180
Figure IV - 2.3-16	Thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLA 95 248 PM.	182
Figure IV - 2.3-17	Thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLA 49 898 PM.	183
Figure IV - 2.3-18	Thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLA 49 898 PM.	187
Figure IV - 2.3-19	Thermogrammes de DSC montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLGA RG504 (48 000 PM) ; Figure du haut : forme brute (avant nébulisation) ; Figure du bas : forme microsphère (après nébulisation).....	189
Figure IV - 2.3-20	Thermogrammes de DSC montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLGA RG504 (48 000 PM) ; Figure du haut : forme brute (avant nébulisation) ; Figure du bas : forme microsphère (après nébulisation).....	190
Figure IV - 2.3-21	Effet d'une trempe sur le polymère PLA (95 248 PM) sous sa forme brute.	191
Figure IV - 2.3-22	Effet d'une trempe sur des microsphères de PLA (95 248 PM).....	193
Figure IV - 2.3-23	Exemples de thermogrammes d'une résine époxy linéaire avec une relaxation enthalpique au niveau de la transition vitreuse. Effet de la vitesse de refroidissement (vitesse de la trempe) et effet du vieillissement (Tirée de Groenewoud, 2001 ^[277]).....	195
Figure IV - 2.3-24	Thermogramme de DSC du PEG-1540 distéarate.....	197
Figure IV - 2.3-25	Effets d'une trempe rapide sur des microsphères de PLA 95 248 PM et PEG-1540 distéarate.	198
Figure IV - 2.3-26	Thermogrammes de DSC des formes polymorphiques et de la forme hydratée de L-158,809	199

Figure IV - 2.3-27	Thermogrammes de DSC des polymorphes de L-158,809	200
Figure IV - 2.3-28	Thermogramme de DSC de la forme hydrate de L-158,809	201
Figure IV - 2.3-29	Thermogramme de DSC du Captopril.....	202
Figure IV - 2.3-30	Thermogrammes de DSC de microsphères de PLA (49 898 PM) avec des teneurs croissantes (10 %, 20 %, 35 %) en L158,809	203
Figure IV - 2.3-31	Thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs en PLA sur L-158,809 égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 % , 10,71 % , 13,74 %) en PEG-1540 distéarate.....	204
Figure IV - 2.3-32	Thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (10 %, 20 %, 35 %) en Captopril.....	207
Figure IV - 2.3-33	Thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs en PLA sur Captopril égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 % , 13,74 %) en PEG-1540 distéarate.....	209
Figure IV - 2.4-1	Spectres Raman de microsphères de trois PLA, de trois masses moléculaires différentes (49 898 PM, 66 815 PM et 95 248 PM)....	212
Figure IV - 2.4-2	Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en L-158,809.	214
Figure IV - 2.4-3	Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en L-158,809 (ratio des teneurs de PLA sur L-158,809 égale à 4) mais avec des teneurs croissantes (3,84 % ; 7,40 % ; 10,71 % ; 13,79 %) en PEG-1540 distéarate.....	215
Figure IV - 2.4-4	Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en Captopril (ratio des teneurs de PLA sur Captopril égale à 4) mais avec deux teneurs, 7,40 % et 13,79 %, en PEG-1540 distéarate.	217
Figure IV - 2.4-5	Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en Captopril.	218
Figure IV - 2.4-6	Spectres Raman des microsphères de PLGA RG504 avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en dexaméthasone.....	219

Figure IV - 2.4-7	Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 875 du PLA en fonction de la teneur en L-158,809 encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM.	231
Figure IV - 2.4-8	Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 1767 du PLA en fonction de la teneur en L-158,809 encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM.	232
Figure IV - 2.4-9	Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 875 du PLA en fonction de la teneur en PEG-1540 distéarate encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM, qui contiennent une teneur constante en L-158,809 (le rapport de la teneur du PLA sur celle du L-158,809 égale quatre).	233
Figure IV - 2.4-10	Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 1767 du PLA en fonction de la teneur en PEG-1540 distéarate encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM, qui contiennent une teneur constante en L-158,809 (le rapport de la teneur du PLA sur celle du L-158,809 égale quatre).	234
Figure IV - 2.4-11	Courbe des ratios moyens des surfaces des pics de la dexaméthasone sur le pic 1770 du PLGA en fonction de la teneur en dexaméthasone encapsulé dans des microsphères de PLGA 48 000 PM.	235
Figure IV - 2.5-1	Cinétique de libération <i>in vitro</i> du L-158,809 des microsphères de PLA 50-50 et 60-40, contenant du PEG-1540 distéarate.	238
Figure IV - 2.5-2	Cinétique de libération <i>in vitro</i> du L-158,809 et du Captopril des microsphères de PLA 66 815 PM sans PEG-1540 distéarate.	241
Figure IV - 3.1-1	Surfaces moyennes normalisées de l'intima, média et lumière artérielle de cinq groupes de rats : le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809 microencapsulé (A)(n = 4); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 10 % de L-158,809 (B)(n = 6); le groupe avec angioplastie, et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 20 % de L-158,809 (C) (n = 5); le groupe avec angioplastie et sans traitement en microsphères de PLA 50-50 (D) (n = 5); le groupe sans angioplastie et sans traitement en microsphères de PLA 50-50 (E) (n = 6).	245
Figure IV - 3.1-2	Surfaces normalisées des lumières artérielles des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de	

	l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	248
Figure IV - 3.1-3	Proliférations néo-intimales des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.....	249
Figure IV - 3.1-4	Rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	250
Figure IV - 3.1-5	Surfaces moyennes normalisées de l'intima, média et lumière artérielle de trois groupes de rats : le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 60-40 sans L-158,809 microencapsulé (A) (n = 5); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 60-40 contenant 10 % L-158,809 (B) (n = 5); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 60-40 contenant 20 % L-158,809 (C) (n = 6).	260
Figure IV - 3.1-6	Surfaces normalisées des lumières artérielles des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	262
Figure IV - 3.1-7	Proliférations néo-intimales des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.....	263
Figure IV - 3.1-8	Rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	264
Figure IV - 3.2-1	Surfaces moyennes normalisées de l'intima, média et lumière artérielle de trois groupes de rats : le groupe avec angioplastie et	

	avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de L-158,809 (A) (n = 5); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de Captopril (B) (n = 6); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril (C) (n = 5).	273
Figure IV - 3.2-2	Surfaces normalisées des lumières artérielles des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de bi-médication par l'administration périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) avec L-158,809 et/ou Captopril. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	275
Figure IV - 3.2-3	Proliférations néo-intimales des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de bi-médication par l'administration périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) avec L-158,809 et/ou Captopril. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	276
Figure IV - 3.2-4	Rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de bi-médication par l'administration périvasculaire de microsphères avec L-158,809 et/ou Captopril. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.	277
Figure IV - 3.3-1	Coupe de carotide de rat du groupe sans angioplastie et sans traitement (représentative pour n = 6 rats).	286
Figure IV - 3.3-2	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et sans traitement (représentative pour n = 5 rats).	287
Figure IV - 3.3-3	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809 (représentative pour n = 4 rats).	287
Figure IV - 3.3-4	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 10 % de L-158,809 (représentative pour n = 6 rats).	288
Figure IV - 3.3-5	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 20 % de L-158,809 (représentative pour n = 5 rats).	289

Figure IV - 3.3-6	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de L-158,809 (représentative pour n = 5 rats).....	290
Figure IV - 3.3-7	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de Captopril (représentative pour n = 6 rats).....	291
Figure IV - 3.3-8	Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril (représentative pour n = 5 rats).....	292

Liste des annexes

ANNEXE VII-A	Démonstration de la formule de l'écart type en fonction de la masse moléculaire en nombre et la masse moléculaire en poids	I
ANNEXE VII-B	Rappel de notions statistiques	IV
ANNEXE VII-C	Spectres d'absorption du L-158,809 et du Captopril dans le THF par spectrophotométrie UV-Visible.....	VI
ANNEXE VII-D	Tailles moyennes des microsphères de différents PLA ou mélanges de PLA, à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, avec ou sans PEG-1540 distéarate, déterminées à différents angles, par spectroscopie de corrélation de photons	VII
ANNEXE VII-E	Spectre Raman des principes actifs utilisés, L-158,809, Captopril et Dexaméthasone	XII
ANNEXE VII-F	Spectre Raman des excipients utilisés, PEG-1540 distéarate, microsphères de PLA 49 898 PM et microsphères de PLGA 48 000 PM	XV
ANNEXE VII-G	Résultats des tests de comparaisons multiples par le test de Sheffé dans les dépôts périvasculaires de microsphères de PLA 50-50, avec L-158,809	XX
ANNEXE VII-H	Résultats des tests de comparaisons multiples par le test de Sheffé dans les dépôts périvasculaires de microsphères de PLA 60-40, avec L-158,809	XXIII
ANNEXE VII-I	Résultats des tests de comparaisons multiples par le test de Sheffé des moyennes dans les dépôts périvasculaires de microsphères de PLA avec L-158,809 et Captopril : Expérience de bi-médication	XXVI

Liste des abréviations et des sigles

- ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine (*Angiotensin-Converting Enzyme*)
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 ADP : Adénosine 5'-diphosphate
 AFM : Microscopie à force atomique ou microscopie à champ proche (*Atomic force microscopy*)
 ANF : Facteur natriurétique (*Atrial Natriuretic Factor*)
 ANOVA one way : Analyse de la variance à une dimension (*Analysis of Variance*)
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNm : Acide ribonucléique messenger
 AT1 et AT2 : Noms des Récepteurs de l'Angiotensine II
 ATP : Adénosine Triphosphate
 Big-ET : Big-endothéline
 bFGF : Facteur de croissance basique des fibroblastes (*Fibroblast Growth Factor*)
 BNP : Peptide natriurétique cérébral (*Brain Natriuretic Peptide*)
 DE₅₀ : Concentration de l'agoniste qui produit le 50 % de son effet maximal ou Dose Efficace 50
 DSC : Analyse enthalpique différentielle (*Differential Scanning Calorimetry*)
 ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine I
 ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline (*Endothelin Converting Enzyme*)
 EDRF : *Endothelium-Derived Relaxing Factor*
 EDHF : *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*
 EDCF : *Endothelium-Derived Contracting Factors*
 ET : Endothéline
 ET-1, ET-2, ET-3 : Endothéline-1, Endothéline-2, Endothéline-3
 ET-A, ET-B et ET-C : Récepteur A, Récepteur B et Récepteur C à l'endothéline
 GMPc : Guanosine 3', 5' monophosphate cyclique
 HDL : *High density lipoprotein*
 HMG CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
 ICAM-1 : Intracellular cell-adhesion molecule 1
 IC₅₀ : Concentration de l'agent compétitif qui inhibe le 50 % de la liaison spécifique (*Inhibitory concentration of 50 %*)
 IL-1 : Interleukine-1
 ISO : Organisation internationale de normalisation (*International Organization for Standardization*)
 LDL : *Low Density Lipoprotein*
 MCP-1 : *Macrophage chemoattractant protein-1*
 NO : Monoxyde d'azote
 NEP : Endopeptidase neutre (*Neutral Endopeptidase*)
 NOS : NO-synthase

- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PCS : Spectroscopie par corrélation de photon (*Photon Correlation Spectroscopy*)
- PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-Derived Growth Factor*)
- PEG : Polyéthylène glycol
- PEG-400 distéarate : Polyéthylène glycol-400 distéarate
- PEG-600 distéarate : Polyéthylène glycol-600 distéarate
- PEG-1540 distéarate : Polyéthylène glycol-1540 distéarate
- PGH₂ : Prostaglandine H₂
- PGL : Poly(glycolate-lactate)
- PLA : Acide polylactique ou poly (D,L-acide lactique)
(*Poly(d, l-lactic acid) ou poly(lactic acid)*)
- PGA : Acide polyglycolique ou poly(acide glycolique) (*poly(glycolic acid)*)
- PLGA : Copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique
ou Poly(D,L-acide lactique-co-acide glycolique)
- PLG : Poly(lactate-co-glycolate)
- PM : Poids moléculaires en poids
- PM_n : Poids moléculaires en nombre
- PN : Proliférations néo-intimales normalisées
- PNA : Peptide natriurétique auriculaire (*Natriuretic Auricular Peptide*)
- QCA : Angiographie coronaire quantitative (*Quantitative Coronary Angiography*)
- RMN : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
- RMS : Écart moyen quadratique (*Root Mean Square*)
- RN : Rapports des surfaces normalisées des intimes sur médias
- SDP : Mode de distribution de taille (*Size Distribution Processor*)
- SEM : Microscope (ou microscopie) électronique de balayage
(*Scanning Electron Microscope or Scanning Electron Microscopy*)
- SN : Surfaces normalisées des lumières artérielles
- SPM ou SPMs : Microscopie par sonde à champ proche
(*Scanning Probes Microscopes*)
- SthM : Microscopie thermique balayante (*Scanning Thermal Microscopy*)
- STM : Microscopie à tunnel (*Scanning Tunnelling Microscopy*)
- T_c : Température de transition de phase
- Test L.S.D : *Least Significant Difference Test* (test statistique)
- T_f : Température de fusion
- T_{fl} : Température de fluidification
- T_g : Température de transition vitreuse (*glass temperature*)
- TGA : Analyse thermogravimétrique ou Thermogravimétrie
(*Thermogravimetric Analysis*)
- TGF- β : Facteur de croissance transformant - β
- THF : Tétrahydrofuranne
- Test H.S.D de Tukey : *Honestly Significant Difference Tukey Test* (test statistique)
- TNF : Facteur de nécrose tumorale α
- Test S.N.K. : *Student-Newman-Keuls Test* (test statistique)

USPNF XVII : Pharmacopée américaine avec le formulaire national, 27^{ième} édition
(*United States Pharmacopeia and National Formulary XVII*)

VCAM-1: Molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1
(*Vascular Cell-Adhesion Molecule-1*)

VEGF : Facteur de croissance endothelial vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VSMC: Cellule musculaire lisse (*Vascular Smooth Muscle Cell*)

Vocabulaires en anglais :

<i>Cantilever</i>	: bras support
<i>correlation function</i> ou <i>noise spectrum</i>	: Fonction de corrélation, fluctuations statistique de la lumière diffusée
<i>Derivative Weight (Deriv.Weight)</i>	: Poids dérivée (fonction dérivée)
<i>Heat Flow</i>	: Débit calorifique
<i>Lipid core</i>	: Centre lipidique, noyau lipidique
<i>Light scattering</i>	: Diffusion de la lumière
<i>macrophages foam cells</i>	: Cellules spumeuses
<i>macrophage scavenger receptors</i>	: Récepteurs éboueurs des macrophages
<i>Optical microscope</i>	: Microscope optique
<i>Phase Imaging</i>	: Imagerie de Phase
<i>Recoil</i>	: Retour élastique de la paroi artérielle
<i>Residue</i>	: Résidu
<i>Scanner</i>	: Numériseur
<i>SDP analysis</i>	: Analyse selon le mode de distribution de taille
<i>Setpoint</i>	: Point de déflexion fixé, fréquence fixée
<i>Self-affinity</i>	: Auto-affinité
<i>Self-similarity</i>	: Auto-similarité
<i>Sieve analysis</i>	: Analyse par tamis
<i>Size</i>	: Taille
<i>Skewness</i>	: Facteur d'asymétrie
<i>Stent</i>	: Endoprothèse coronaire
<i>Surface Potential Microscopy</i>	: Microscopie à potentiel de surface
<i>TappingTM</i>	: Mode contact intermittent
<i>Temperature</i>	: Température
<i>Tip</i>	: Sonde
<i>Weight</i>	: Poids

*À la mémoire de mon frère Guy,
en souvenir de sa bonté et de sa gentillesse.*

*À ma mère et à mon père, en témoignage de
ma profonde reconnaissance pour leur
affection et leur dévouement.*

Remerciements

En premier lieu, je remercie le professeur Jean-Norbert McMullen pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans son laboratoire et pour m'avoir permis de mener à terme cette thèse. Grâce à lui, j'ai ainsi pu découvrir et aborder concrètement la pharmacie galénique et également me perfectionner dans le domaine de la microscopie à champ proche, en particulier le microscope à force atomique.

Bien sûr, je remercie aussi le professeur Emanuel Escher, mon co-directeur du Département de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke pour m'avoir permis de réaliser les expériences *in vivo* de pharmacologie dans son laboratoire et d'aborder ainsi le domaine de la resténose cardiovasculaire.

Mes remerciements vont également au Dr. Dung Pham pour ses précieux conseils techniques et pratiques au cours des expériences *in vivo* sur les rats, en particulier pour son aide pratique primordiale des chirurgies et des procédures d'angioplastie pratiquées sur les rats. Il a une excellente maîtrise et expertise des chirurgies d'angioplastie.

Je voudrais aussi remercier le professeur. Thomas Ellis, du Département de Chimie de l'Université de Montréal pour ses conseils avisés sur la spectroscopie Raman et pour m'avoir permis de réaliser les expériences avec le spectromètre Raman.

Je voudrais remercier le Dr. Samir Élouatik, professionnel de recherche et responsable du Laboratoire de Caractérisation des Matériaux (LCM), au Département de Chimie de l'Université de Montréal, pour ses conseils et son aide, ainsi que pour sa participation concrète à l'application de la spectrométrie Raman dans le domaine pharmaceutique.

Je voudrais également remercier le professeur Antonella Badia, du Département de Chimie de l'Université de Montréal pour m'avoir fait découvrir la microscopie à force atomique, au travers du Nanoscope de la compagnie Digital Instrument.

Par la même occasion, je tiens à remercier Maritza Volel pour m'avoir montré les possibilités de la microscopie à force atomique avec le Nanoscope.

Je remercie également le professeur Julian X.X. Zhu, qui a aimablement accepté de m'avoir permis d'utiliser les appareils de thermogravimétrie à haute résolution et d'analyse thermique différentielle de son laboratoire.

Je remercie également le Dr. Laurent Masaro ainsi que Wilms Baille pour leurs aides dans l'utilisation des appareils d'analyse thermique du laboratoire du professeur Julian X. X. Zhu.

Je voudrais aussi remercier Glenn Poirier et Lang Shi, pour m'avoir permis d'utiliser le microscope à force atomique Dimension 3100 de la Compagnie Digital Instrument.

Enfin, je remercie l'organisme des fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche ainsi que la faculté de Pharmacie, en particulier son représentant le professeur Huy Ong, vice-doyen aux études et à la recherche et enfin la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier tout au long de ce projet.

Introduction

Le cadre de cette thèse porte sur le développement, la caractérisation et la mise au point de vecteurs polymériques microparticulaires nébulisés destinés à l'incorporation de principe actif, comme le L-158,809 et le Captopril, pour des études sur l'inhibition de la prolifération néo-intimale dans des modèles d'artère de rats, après une procédure d'angioplastie.

La thèse est constituée de trois parties bien distinctes.

La première partie consiste en une revue de la littérature. Compte tenu de la nature des travaux qui touche plusieurs champs variés d'expertise tels que les sciences pharmaceutiques (notamment la technologie pharmaceutique), la chimie, la caractérisation chimique des vecteurs microparticulaires et la pharmacologie, il a été important de bien compléter cette partie. C'est pourquoi, la revue de littérature vise à fournir au lecteur une bonne compréhension des concepts traités et surtout de la terminologie variée afin qu'il puisse appréhender la partie expérimentale en toute quiétude. Ainsi, il a été nécessaire de situer le contexte de l'athérosclérose pour ensuite aborder celui de la resténose post-angioplastie avant d'entrer dans les différentes stratégies de prévention puis de traitement local de la resténose. Vient ensuite le secteur des technologies pharmaceutiques qui, après clarification des concepts propres à la libération contrôlée des médicaments, présente les différentes classes principales de vecteurs microparticulaires ainsi que leurs modes de production. Cette démarche a pour but de faire comprendre au lecteur les motivations qui amènent au choix du procédé d'obtention du vecteur choisi. Enfin, la partie relative à la caractérisation est importante car elle veut montrer la possibilité d'appliquer des concepts physiques et mathématiques ainsi que des techniques analytiques les plus récentes au domaine pharmaceutique. Par exemple deux outils très peu utilisés dans le secteur pharmaceutique, ont été dans le cadre de cette thèse, particulièrement exploités. En premier lieu, il s'agit de la microscopie à force atomique dont les applications abordées

s'étendent autant dans le champ de l'imagerie que dans celui de l'univers des fractales, dont le concept mathématique d'analyse concrétise la complexité de surface des microsphères nébulisées. En second lieu, il s'agit de la spectroscopie Raman pour laquelle les retombées récentes des recherches spatiales ont été profitables car il est désormais possible de procéder à une analyse Raman de la surface chimique des microsphères avec une meilleure résolution spectroscopique.

La deuxième partie présente les matériels et méthodes utilisés dans le cadre des recherches spécifiques à cette thèse en technologie pharmaceutique. Elle comporte un premier volet, propre à la fabrication pharmaceutique des microsphères par nébulisation, un second, propre à leur caractérisation et un troisième volet traite de l'évaluation *in vivo* pour évaluer le potentiel de libération d'un médicament microencapsulé hors des microsphères au moyen de dépôt périvasculaire dans le modèle d'artère de rats Sprague Dawley, après une procédure d'angioplastie au ballonnet.

La troisième partie expose les résultats obtenus, leurs interprétations et les discussions qu'ils entraînent.

Enfin une discussion générale et une conclusion concluent l'ensemble des études présentées et traite également des perspectives futures.

I Revue de la Littérature

La revue de la littérature est répartie en sept chapîtres dans le but de couvrir l'ensemble des concepts et des terminologies propres aux recherches effectuées.

I - 1 La problématique des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies en voie de progression dans les sociétés industrialisées. Elles sont le signe d'un désordre de la fonction cardiaque ou du système circulatoire. Selon les statistiques du dernier rapport 2004 sur la santé dans le monde, *l'Organisation Mondiale de la Santé* (OMS) rapporte que les maladies cardiovasculaires représentent 29,3 % des causes de mortalité dans le monde ^[1]. Ainsi, en terme démographique l'OMS signifie que 16,7 millions de personnes meurent à travers le monde chaque année des maladies cardiovasculaires. En Amérique du Nord l'athérosclérose compte pour près des trois quarts de tous les décès causés par les maladies cardiovasculaires en occupant la première place comme l'indiquent les dernières statistiques 2004 de *l'American Heart Association* et de *l'American Stroke Association* ^[2].

I - 2 Athérosclérose

L'OMS définit l'athérosclérose comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôt calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média ». En fait, l'athérosclérose est d'abord une pathologie de l'intima et, par définition, est caractérisée par une athérose et par une sclérose.

I - 2.1 Structure d'une artère normale

Le modèle d'organisation d'une artère normale présente une paroi artérielle concentrique autour d'une lumière dans laquelle circule le sang. Chaque artère reçoit ses substances nutritives par diffusion, à partir de la lumière et aussi à partir des *vasa vasorum*, qui nourrissent l'adventice et qui peuvent s'étendre jusqu'à la média, voire l'intima^[3]. En effet, la paroi d'une artère comporte trois tuniques, qui de l'extérieur vers l'intérieur sont les suivantes : l'**adventice**, qui est la tunique externe, la **média**, qui est la tunique médiale et l'**intima**, qui est la tunique interne.

L'**adventice** est constitué d'un tissu conjonctif, peu organisé mais riche en collagène et en fibres élastiques, avec des fibroblastes et des adipocytes, une enveloppe pour l'ancrage des artères aux structures voisines, un réseau de *vasa vasorum*, nourricier pour l'adventice, s'étendant jusqu'à la partie externe de la média, un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés, allant jusqu'à la média et quelques fibres musculaires lisses longitudinales.

Tunique la plus épaisse, la **média** présente plusieurs couches de cellules musculaires lisses, empilées les unes sur les autres formant des unités lamellaires dont le nombre est fonction du type d'artère comme par exemple, les artérioles qui ont une couche alors que les artères élastiques en ont plusieurs. Ces cellules musculaires lisses sont entourées d'une matrice extra-cellulaire à base de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides. Exceptée l'artère aortique, la média reste avasculaire ; toutefois sa partie externe est irriguée par des *vasa vasorum* de l'adventice. Dans le cas des vaisseaux de gros calibre, une lame d'élastine, appelée la limitante élastique externe, démarque la média de l'adventice.

Tunique la plus interne, l'**intima** est aussi la plus fine et possède un endothélium formé d'une couche unique de cellules imbriquées qui forment une couche étanche, mais cependant semi-perméable et une couche sous endothéliale de tissu conjonctif fibro-élastique. Cette couche contient des fibres de collagène, des fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes qui synthétisent des substances telles que des

protéoglycannes, des glycosaminoglycannes dont des héparane-sulfates (produites aussi par les cellules endothéliales), du glycogène, de l'élastine et de la laminine. Le système immunitaire y est aussi représenté par quelques cellules. L'intima possède aussi une lame d'élastine, appelée la limitante élastique interne, qui peut être absente parfois.

I - 2.2 Physiopathologie de la lésion athérosclérotique

La lésion athérosclérotique se présente sous la forme d'une métamorphose lente, progressive et évolutive de l'intima.

I - 2.2.1 Stades de la lésion athérosclérotique

Une classification anatomopathologique de la lésion athérosclérotique, proposée par Stary et coll. en 1994 et approuvée par l'*American Heart Association*, présente une évolution de la genèse de la plaque athérosclérotique ou plaque d'athérome en huit étapes [4 ; 5 ; 6]. Brièvement, ces huit sont les suivantes :

Les lésions précoces :

- Stade I : Épaississement de l'intima ou coussinet intimal

Un épaississement fibromusculaire de l'intima, apparaissant dès la vie fœtale, se produit lorsque des macrophages s'accumulent au niveau sous-endothélial et se chargent de lipides. Ces macrophages prennent alors le nom de cellules spumeuses (*macrophages foam cells*). Dans le même temps, sans que la lumière vasculaire ne soit pour autant affectée, il y a aussi un début de prolifération des cellules musculaires lisses et une activité plaquettaire normale d'agrégation. Finalement, l'ensemble des activités des macrophages, des cellules musculaires lisses et des plaquettes conduisent à un épaississement diffus de l'intima qui devient alors un terrain propice pour le développement de la lésion athérosclérotique.

- Stade II : Les stries lipidiques

Ces stries de cellules spumeuses se chargent encore de lipides et par des stratifications adajacentes, évoluent en des stries graisseuses. Également, les cellules musculaires lisses contiennent maintenant des gouttelettes de lipides mais en moins grande quantité que dans les macrophages. Des lymphocytes T, moins nombreux que les macrophages, sont aussi présents.

Les lésions intermédiaires :

- Stade III : Le stade pré-athérome

La strie graisseuse continue de se charger de lipides intracellulaires et extracellulaires, de macrophages et de cellules musculaires lisses, chez le jeune adulte, brisant ainsi la cohérence des cellules musculaires lisses intimes. Il s'agit du stade pré-athérome. Quelques lymphocytes et mastocytes, par leur infiltration dans l'intima, participent également à ce type de lésion. Les lésions de ce type sont dites pré-athéromateuses. Le stade III est un stade intermédiaire entre les lésions précoces (stade I et stade II) et les lésions avancées (stade IV, stade V et stade VI).

Les lésions avancées :

- Stade IV : Le stade athéromateux

L'accumulation de lipides extracellulaires devient plus dense (*lipid core*) et occupe une région bien définie de l'intima. Cette lésion prend le nom d'*athérome*, commence à faire saillie dans la lumière artérielle et apparaît excentrée. Les cellules musculaires lisses et la matrice intercellulaire de l'intima sont repoussées et dispersées puis remplacées par les lipides extracellulaires. La région intimale entre le dense noyau lipidique et la surface endothéliale contient des macrophages, des cellules spumeuses et des cellules musculaires lisses, des lymphocytes et des mastocytes. Des granules des ions de calcium apparaissent aussi dans la plaque. C'est le stade de la plaque d'athérome simple, non compliquée à partir duquel les lésions athérosclérotiques sont considérées avancées.

- Stade V : Le stade fibro-athéromateux

La plaque d'athérome devient de plus en plus fibreuse et se calcifie. Les lésions de ce type rendent la lumière artérielle plus étroite que dans le stade IV. C'est le stade ultime où la plaque d'athérome fibro-lipidique reste encore non compliquée.

- Stade VI : La plaque d'athérome compliquée

La plaque d'athérome s'étend désormais à la fois longitudinalement et sur toute la circonférence de l'artère ce qui diminue encore plus la lumière artérielle. De plus, elle se complique avec l'apparition de fissures et de ruptures, avec thromboses et infiltrations hémorragiques. Le stade VI est donc le **stade critique au cours duquel il y a une rupture de la plaque**. Toutes fissures, ulcérations ou ruptures de la plaque libèrent son contenu dans le flot sanguin et constituent par ce fait un risque d'embolie. En outre, toutes hémorragies amènent la plaque à augmenter de volume, ce qui rétrécit considérablement la lumière artérielle. Les plaques d'athéromes peuvent être de deux natures soit il s'agit de plaques fibreuses stables, à évolution progressive ou soit il s'agit de plaques fibreuses instables, molles avec un gros noyau lipidique, à risque. En fonction de la nature de la plaque fibreuse, les thromboses ont des conséquences différentes lors de la rupture de la chape fibreuse. Ainsi, il peut se produire un hématome intra-plaque avec infiltration du thrombus dans la plaque, qui augmente alors la taille de la plaque. Il peut y avoir formation d'un néo-thrombus qui bouche la lumière artérielle (cas de l'infarctus du myocarde). Enfin, il peut y avoir un détachement du thrombus qui part dans la circulation artérielle, avec alors un risque d'embolie ultérieurement. Les schémas des coupes d'artères pour chacun des six premiers stades de la lésion athérosclérotique sont illustrés dans la Figure I - 2.2-1 ^[6].

- Stade VII : La plaque calcifiée

Avec le vieillissement, la plaque se calcifie gravement et se durcit

- Stade VIII : La plaque fibro-calcaire

La plaque finit par devenir essentiellement fibro-calcaire et scléreuse, n'ayant alors plus de lipide ou peu. Il s'agit, soit d'une évolution terminale, soit d'une forme avancée qui peut encore se compliquer avec un retour au stade VI.

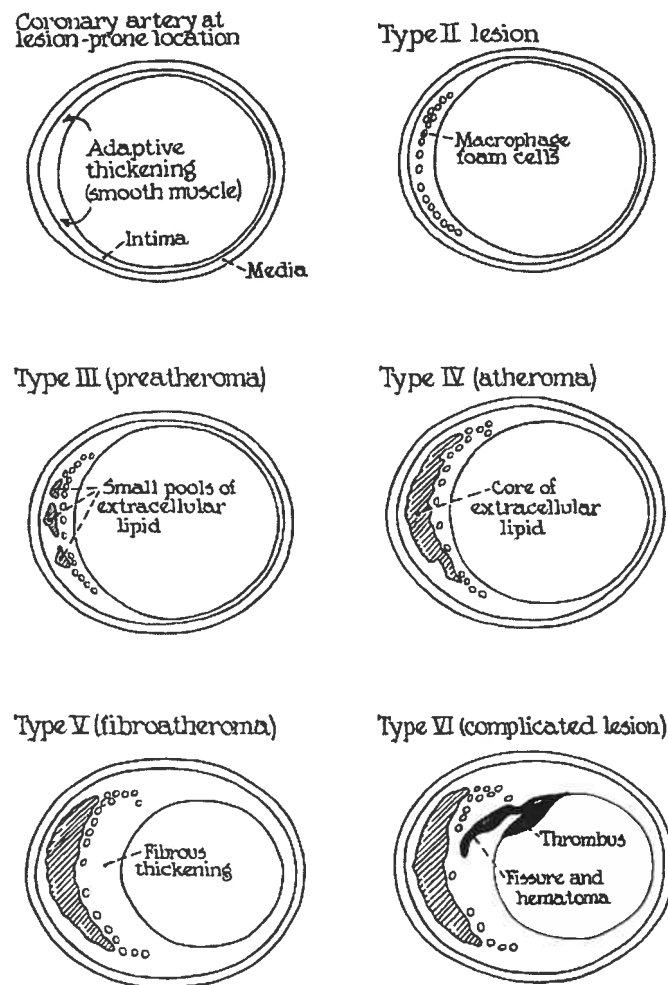


Figure I - 2.2-1 Schémas des sections des coupes d'artères des six premiers stades de la lésion athérosclérotique. (Tirée de Stary et coll., 1995 ^[6])

I - 2.3 Pathogenèse de l'athérosclérose : Athérogenèse

Les dernières recherches ont permis de comprendre que l'athérosclérose ne se réduit pas à un simple « *problème de tuyauterie* » car les artères ne peuvent plus être considérées comme des tuyaux rigides. Au début, l'explication simpliste consistait à penser que l'origine de l'athérosclérose était due à une accumulation de substances grasses, au niveau de la face interne des parois artérielles, qui finissait par boucher l'artère. Maintenant il est bien accepté que l'évolution d'une lésion athérosclérotique implique une participation active des parois artérielles, puisque celles-ci sont formées de cellules vivantes en constante communication, non seulement entre elles mais aussi avec leur entourage et leur environnement immédiat. De plus, il est bien rare que des dépôts gras grossissent au point d'obturer l'artère puisque selon la physiopathologie de la lésion athérosclérotique, l'étape la plus à risque est bien la rupture de la plaque d'athérome (Stade VI). D'autre part, il est désormais bien reconnu que la mise en place de la lésion athérosclérotique est le fait d'un processus inflammatoire de l'endothélium vasculaire.

I - 2.3.1 Endothélium vasculaire

Le rôle de l'endothélium dans la physiologie de la circulation sanguine est reconnu depuis longtemps car déjà en 1966, Lord Adrian Florey considérait l'endothélium vasculaire dans son ensemble comme une barrière protégeant la paroi vasculaire ^[7]. Plus tard des expériences, comme celles de Furchgott et Zawadski (1980), ont montré que l'endothélium pouvait aussi participer dans des mécanismes régulatoires, synthétiques, et métaboliques ^[8].

Le principal effet physiologique de la stimulation de l'endothélium est la vasodilatation et le contrôle local de la musculature vasculaire dépendant de l'équilibre entre les vasodilatateurs et les vasoconstricteurs endothéliaux. Dès lors, toute altération du flot sanguin dans les vaisseaux se répercute sur la structure de la paroi vasculaire, ce qui permet d'établir un lien entre la dynamique sanguine et le développement des lésions

athérosclérotiques. Or l'intégrité de la fonction endothéliale est avant tout essentielle pour la vasomotricité et la trophicité de la paroi artérielle. De plus, un endothélium sain est aussi anti-athérogénique, c'est à dire qu'il peut inhiber l'agrégation et l'adhésion plaquettaire, la prolifération des cellules musculaires lisses, et l'adhésion leucocytaire. C'est pourquoi, tout dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire aurait alors un impact certain sur la pathogenèse de l'athérosclérose.

À court terme, l'endothélium contrôle l'état de tension du vaisseau et ainsi le débit sanguin tissulaire. Il produit des facteurs vasodilatateurs comme le monoxide d'azote NO, les prostacyclines (PGI_2) et la bradykinine. Il produit aussi un facteur hyperpolarisant appelé EDHF pour *endothelium derived hyperpolarizing factor*. Enfin, il est le lieu de production de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II, le thromboxane A_2 (TXA_2), et la prostaglandine H_2 (PGH_2) [9]. Par contre, à long terme, l'endothélium agit sur la structure de la paroi artérielle en produisant ces mêmes facteurs qui stimulent (endothéline, angiotensine II) ou bien inhibent (NO) la croissance des cellules musculaires lisses [10].

La vasorégulation est aussi sous le contrôle de stimuli biochimiques et mécaniques. En effet, le flux sanguin est contrôlé au niveau systémique par le système rénine-angiotensine circulant dans lequel une variation du volume plasmatique et de la pression sanguine systémique enregistrée par le rein conduit aussitôt à une variation du taux circulant de rénine et d'angiotensine. Le rôle de l'endothélium dans cette régulation systémique générale consiste en la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II et sa migration vers les cellules musculaires lisses vasculaires.

Une autre forme de régulation du flux sanguin parvenant aux tissus concerne le niveau local, tissulaire où intervient la synthèse *in situ* de peptides vasoactifs dont l'endothéline, la bradykinine et le peptide natriurétique auriculaire (NAP), par l'endothélium vasculaire. Également, les cellules endothéliales assurent la fin des actions de ces même peptides [10].

I - 2.3.1.1 Enzymes endothéliales

Trois enzymes endothéliales contribuent intensément au métabolisme des peptides vasoactifs : L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (dipeptidyl carboxypeptidase I , EC 3.4.15.1), l'endopeptidase neutre et l'enzyme de conversion de la big endothéline.

I - 2.3.1.1.1 Enzyme de conversion de l'angiotensine I

Le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans l'homéostasie cardiaque et dans la régulation de l'équilibre électrolytique ^[11]. Ce système est régulé par la rénine, qui est produite par le rein dans l'appareil juxta-glomérulaire suite à une baisse de la pression dans l'artériole afférente du glomérule rénal ou à une diminution de la concentration en ions sodium Na^+ dans le tubule distal ou encore à une stimulation du système nerveux sympathique ^[12].

L'angiotensinogène, qui est une globuline plasmatique essentiellement d'origine hépatique, est clivée par la rénine pour donner un décapeptide inactif, l'angiotensine I ^[11]. Par la suite, une enzyme de la classe des métallopeptidases à zinc appelée enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) agit comme une dipeptidyl carboxypeptidase en activant l'angiotensine I en angiotensine II par clivage du dipeptide carboxy-terminal His-Leu de l'angiotensine I.. L'autre substrat physiologique touché par cette enzyme est la bradykinine qui est inactivée par hydrolyse séquentielle de ses deux dipeptides carboxy-terminaux ^[10]. À son tour, l'angiotensine II est clivée par l'aminopeptidase A en un heptapeptide du nom d'angiotensine III, laquelle est convertie ensuite par action de l'aminopeptidase B ou M en angiotensine IV ^[12]. L'ECA (ou *Angiotensin-Converting Enzyme* ou ACE) se retrouve abondamment dans la paroi des vaisseaux qui irriguent les poumons mais aussi dans le cœur, les reins et le cerveau. Outre l'ECA endothéliale, il existe également une ECA plasmatique

circulante, beaucoup moins abondante et qui proviendrait des cellules endothéliales vasculaires par un mécanisme de protéolyse spécifique ^[13]. Les inhibiteurs de l'ECA inhibent alors aussi bien l'enzyme tissulaire que l'enzyme plasmatique c'est pourquoi la part relative de l'inhibition plasmatique versus l'inhibition tissulaire de l'ECA est souvent difficile à préciser ^[10]. Ainsi dans les situations physiologiques normales, l'ECA plasmatique serait principalement d'origine endothéliale. L'ECA est aussi présente dans d'autres constituants de la paroi vasculaire comme les cellules musculaires lisses vasculaires et l'adventice ^[13]. L'ECA peut être sous la dépendance d'une régulation physiologique ^[14 ; 15 ; 16], d'une régulation pathologique ^[17 ; 18 ; 19], d'une régulation pharmacologique ou d'une régulation génétique ^[20 ; 21 ; 22]. Par exemple, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion apportés à des cellules endothéliales en culture augmentent le taux de transcription du gène de l'ECA mais la concentration d'ECA ^[23]. Par contre, la concentration d'ECA n'est pas augmentée par d'autres inhibiteurs du système rénine-angiotensine, comme les inhibiteurs de la rénine ou les antagonistes non peptidiques de l'angiotensine II, ce qui exclurait la participation de l'angiotensine II à cette régulation ^[10].

I - 2.3.1.1.2 Endopeptidase neutre

L'endopeptidase neutre (NEP : *neutral endopeptidase*), encore appelé enképhalinase (EC 3.4.24.11) est une métalloprotéase membranaire à zinc ^[24]. La NEP est présente dans la paroi vasculaire et dans les cellules endothéliales vasculaires, artérielles et veineuses ^[25]. Cette enzyme est localisée notamment dans le cerveau et le rein. La NEP endothéliale vasculaire agit sur plusieurs substances vasoactives tissulaires locales ou circulantes comme le peptide natriurétique auriculaire et le peptide natriurétique cérébral (BNP : *brain natriuretic*

peptide)^[26]. Deux autres substrats sont aussi métabolisés par la NEP. Le premier est la bradykinine, qui est clivée en bradykinine 1-7 et 1-5, alors que le second est l'endothéline^[10]. Compte tenu de la similarité du mécanisme d'action catalytique de la NEP et de l'ECA, plusieurs inhibiteurs mixtes ont été développés afin d'inhiber à la fois la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II et la dégradation de la bradykinine^[27]. En l'état actuel des connaissances, il ne semble pas y avoir de régulation physiopathologique et de déterminisme génétique de la NEP identifié dans le domaine de la pathologie cardiovasculaire^[10].

I - 2.3.1.1.3 Enzyme de conversion de l'endothéline

Il existe trois formes d'endothélines qui sont issues de trois précurseurs différents, de 200 acides aminés chacun, appelés les préproendothélines, chacune codée par un gène différent^[28 ; 29]. Par la suite, les préproendothélines sont clivées par coupures protéolytiques en proendothélines ou *big endothélines* (*big ET-1*, *big ET-2*, *big ET-3*). Enfin, des enzymes spécifiques à chaque forme, les *endothelin converting enzymes* ou ECE clivent les *big endothélines* en endothélines^[30]. L'ECE est une métalloprotéase à zinc qui est présente dans les membranes plasmiques des cellules endothéliales^[31]. Des études ont montré que l'activité de la ECE peut être bloquée par le phosphoramidon qui est un inhibiteur des métalloprotéases à zinc mais pas par le thiorphan, le Captopril et le kélatorphan ce qui pourrait exclure la participation de l'ECA et de la NEP dans la conversion de la big endothéline en endothéline^[29 ; 32 ; 33 ; 34]. Des trois isoformes peptidiques d'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3), la cellule endothéliale ne synthétise que l'endothéline-1 (ET-1)^[10].

I - 2.3.1.2 Vasodilatateurs endothéliaux

L'endothélium a la possibilité de se relaxer lorsqu'il est en présence de certains neurotransmetteurs, hormones ou substances d'origine plaquettaire. Également, des stimuli exercés par le sang circulant sur l'endothélium peuvent aussi induire une vasodilatation adaptative de l'endothélium. À ce moment, plusieurs facteurs endothéliaux vasorelaxants interviennent. Les plus importants sont le monoxyde d'azote et les prostacyclines.

Le NO est probablement le plus puissant vasodilatateur [35 ; 36]. Il est synthétisé par des NO-synthases (NOS) [37]. À grande concentration, le NO est cytotoxique [38]. Le NO est un radical libre gazeux, modérément stable en milieu aqueux avec une fonction de messenger biologique en milieux physiologiques. Du fait de sa petite taille, le NO peut diffuser à travers les membranes biologiques. Il a un très court temps de demi-vie et réagit rapidement avec l'anion superoxide $O_2^{\bullet -}$ pour former le peroxynitrite $(OONO^-)^{\bullet}$ qui est un puissant oxydant [39]. Les principales implications des effets physiologiques de NO sur le système cardiovasculaire ont fort bien été décrites et rapportées par Loscalzo et Welch [38]. En particulier, le NO intervient dans la régulation des propriétés antithrombotiques de l'endothélium vasculaire car il maintient son intégrité en régulant l'interaction entre les plaquettes sanguines et la paroi vasculaire. Une fois produit, le NO diffuse des cellules endothéliales vers la lumière du vaisseau sanguin où il interagit avec les plaquettes. Le NO inhibe alors l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et désagrége les plaquettes. Les plaquettes contiennent aussi des NOS qui sont activées lors de l'agrégation. Les propriétés anti-thrombotiques de la surface endothéliale sont dues en fait aux actions synergiques de NO et des prostacyclines. Enfin, le NO inhibe l'adhésion des plaquettes à l'endothélium vasculaire. De plus, la production de NO, basale ou active, inhibe la contraction des cellules musculaires lisses endothéliales mais aussi leur prolifération de la paroi vasculaire.

Avec le NO, les prostacyclines sont aussi relâchées par l'endothélium en réponses aux stimuli du flot sanguin sur la surface endothéliale et à l'hypoxie. Elles augmentent aussi la production de GMPc dans les cellules musculaires lisses et les plaquettes ^[40]. Dans les plaquettes sanguines, les prostacyclines et le NO agissent en synergie pour inhiber l'agrégation des plaquettes ^[41].

Par ailleurs, la stimulation de l'endothélium par l'acétylcholine produit également une hyper polarisation de la sous-couche de cellules musculaires permettant la vasodilatation. Ceci est le résultat d'une substance sécrétée par l'endothélium et qui contribue à des vasodilatations par ouverture des canaux potassiques dépendant de l'ATP (adénosine triphosphate) dans le muscle vasculaire lisse. Cette substance est diffusible, relaxante et hyper polarisante, différente de NO et des prostacyclines. C'est pourquoi, elle a été appelée EDRF ou endothelium-derived hyperpolarizing factor ^[42].

I - 2.3.1.3 Vasoconstricteurs endothéliaux

Plusieurs facteurs endothéliaux vasocontracturants existent, mais les principaux demeurent les endothélines, l'angiotensine II, les thromboxane A2 et prostaglandine H2.

Au nombre de trois, les endothélines (ET-1, ET-2, ET-3) sont des peptides de 21 acides aminés. Chacune d'elles dérive d'une préproendothéline différente qui sera clivée en proendothéline ou big-endothéline (big ET-1, big ET-2, big ET-3). Les big endothélines sont ensuite clivées par les ECA pour donner les endothélines respectives. Soupçonnée en 1985 par l'équipe de Hickey, l'ET-1 a pu être isolé et cloné par Yanagisawa et ses collaborateurs en 1988 ^[43 ; 44]. L'ET-1, qui a un court temps de demi-vie (quelques secondes), est la seule endothéline synthétisée par l'endothélium vasculaire pour exercer un effet vasodilatateur bref

suivi d'un effet vasoconstricteur et hypertenseur puissant et prolongé [45]. L'ET-1 possède également un effet mitogénique sur les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules mésangiales glomérulaires rénales. Par son effet mitogénique et trophique, l'endothéline contribuerait au remodelage hypertrophique des vaisseaux, c'est-à-dire à l'augmentation de la quantité de tissu dans la paroi vasculaire par opposition au remodelage eutrophique qui implique un réarrangement de la même quantité de tissu dans la paroi vasculaire. La sécrétion d'endothéline est contrôlée par des vasodilatateurs tels que NO et ANF (le facteur natriurétique). Dans certains vaisseaux sanguins comme les artères coronaires, les récepteurs de l'endothéline des muscles vasculaires lisses dépendent des canaux calciques voltage-dépendant, ce qui peut expliquer que des antagonistes calciques puissent diminuer la vasoconstriction induite par l'endothéline [46 ; 47]. Par ailleurs, l'endothéline potentialise aussi les effets d'autres vasoconstricteurs comme la sérotonine ou la noradrénaline, même à lorsque leurs concentrations n'induisent normalement pas des réponses contractiles [48]. Lotersztajn a rapporté plusieurs effets non vasculaires des endothélines [30].

L'angiotensine II est issue d'un clivage de l'angiotensine I essentiellement par l'ACE dans le système rénine-angiotensine. Toutefois, il semble aussi exister d'autre voie que celle de l'ACE pour former l'angiotensine II comme celle des chymases [49]. L'angiotensine II participe majoritairement à la pathogenèse de l'athérosclérose car ce peptide provoque une vasoconstriction puissante sur les cellules musculaires lisses vasculaires [50]. Il élève donc la pression artérielle et stimule également la sécrétion d'aldostérone permettant la réabsorption de sels et d'eau [11]. Tandis que l'angiotensine II circulante, produite par l'ACE endothéliale pulmonaire, est impliquée dans l'homéostasie cardiovasculaire aiguë, l'angiotensine II vasculaire et locale entretient plutôt le tonus vasculaire ainsi que la fonction cardiaque à long terme [50 ; 51]. En outre, comme la production locale d'ACE est un important modulateur de la structure et de la fonction tissulaire, la moindre fluctuation de sa quantité régule alors les

taux de production d'angiotensine II et de dégradation de la bradykinine dans les tissus ^[11]. L'angiotensine II suscite la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses en activant principalement les récepteurs AT1 ^[50]. Une grande présence d'angiotensine II contribue à la production de superoxydes par augmentation de l'activité des oxydases NADH/NADPH vasculaires, sources d'anions superoxydes, *in vivo* et *in vitro*, en raison de la participation indirecte de l'ACE. Goodfriend et coll. ont très bien illustré les multiples actions de l'angiotensine II sur divers tissus comme les artères, les reins, les glandes surrénales, le cœur, le cerveau et le système nerveux central ^[52]. Déjà reconnues, les caractéristiques attribuées à l'angiotensine II sont principalement les suivantes ^[11] : agent vasoconstricteur, agent pro-thrombotique, agent pro-inflammatoire, promoteur de croissance, agent pro-oxydant et agent pro-athérogénique.

Récepteurs de l'angiotensine II :

Dans l'article de Goodfriend et coll. figure aussi une excellente description des récepteurs AT1 et AT2 de l'angiotensine II. Par exemple, il est montré que le récepteur AT1 est une protéine transmembranaire ^[52]. Il est dit aussi que bien qu'ils aient des affinités similaires pour l'angiotensine II, les récepteurs polypeptidiques AT1 et AT2 de l'angiotensine II ont chacun une fonctionnalité différente. Différentes localisations des récepteurs AT1 et AT2 de l'angiotensine II ont aussi été répertoriées par Berry et Coll. (2001) ^[53] et par De Plaen (1998) ^[54].

Sous certains stimuli, l'endothélium synthétise et relâche d'autres facteurs vasoconstricteurs notamment des EDCF (EDCF : *endothelium-derived contracting factors*). Ces EDCF sont généralement des prostanoides vasoconstricteurs tels que la prostaglandine H₂ et le thromboxane A₂ ^[55]. La prostaglandine H₂ et le Thromboxane A₂ exercent un effet vasoconstricteur local et systémique ^[50]. Ces molécules activent le récepteur

thromboxane au niveau des cellules musculaires lisses et des plaquettes, limitant ainsi les effets vasculaires de NO et des prostacyclines^[50].

Par ailleurs, Guerci et coll. ont classifié et illustré admirablement divers types de stimuli ayant une incidence sur le tonus vasculaire de l'endothélium^[55]. Il s'agit principalement des facteurs neurohumoraux, des stress exercés sur la paroi vasculaire, des forces d'étirement, de l'hypoxie et de l'ischémie.

I - 2.4 Inflammation et mise en place de la lésion athérosclérotique

Le processus d'inflammation joue un rôle majeur dans la mise en place de la lésion athérosclérotique^[56]. Il a surtout été mis en évidence à partir d'études sur la LDL (*low density lipoprotein*) qui est une lipoprotéine de basse densité. Dans le langage courant la LDL est connue sous le nom de mauvais cholestérol à l'instar de la HDL (*high density lipoprotein*), lipoprotéine de haute densité, connue sous le nom de bon cholestérol. Les LDL et les HDL assurent le transport du cholestérol entre le foie, son lieu de synthèse, et les intestins et les autres organes. Bien que le cholestérol et le LDL soient nécessaires à l'organisme, leur excès favorise cependant l'athérosclérose, en stimulant la formation des plaques d'athérome.

En fait, le problème ne se pose pas quand la concentration des LDL reste modérée car les LDL peuvent entrer et sortir librement de l'intima. Par contre, lorsque la concentration des LDL devient trop grande, les LDL commencent à se rassembler dans l'intima et se fixent aussi dans la matrice extracellulaire sous-jacente. L'accumulation des LDL dans l'intima conduit non seulement à l'oxydation des lipides et des protéines qui les composent mais aussi à des glycosylations par fixation de sucres sur leurs protéines. Ces modifications sont alors intégrées et semblent être interprétées par les cellules de la paroi vasculaire comme un signal de danger, ce qui a pour conséquence d'alerter les cellules du

système immunitaire. À ce moment, grâce à leurs molécules adhésives de surface, les cellules endothéliales, en regard à la lumière artérielle, vont fixer les cellules inflammatoires quiescentes que sont les monocytes, circulant dans le sang. Les sélectines, qui font partie de ces molécules adhésives, amènent essentiellement, par un jeu d'interaction (*rolling interaction*), les monocytes à se fixer aux cellules endothéliales puis l'attachement devient plus ferme grâce aux intégrines (Figure I-2.4-1) ^[57]. D'autres molécules adhésives pourraient être aussi impliquées dans cette démarche comme la VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule-1*) et la ICAM-1 (*intracellular cell-adhesion molecule-1*) ^[57].

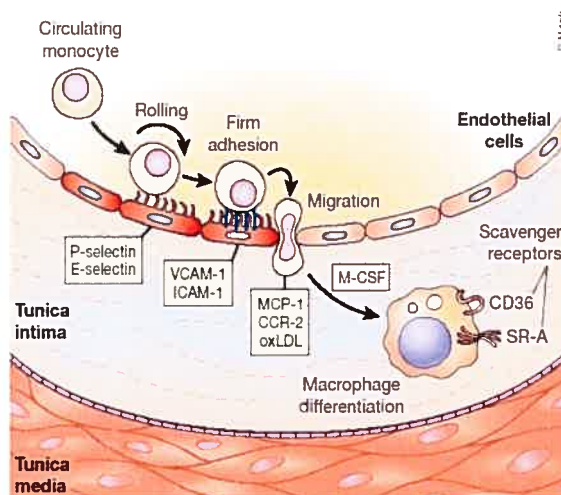


Figure I - 2.4-1 Recrutement des monocytes et leur transformation en macrophages spumeux (Tirée de Li et Glass, 2002) ^[57].

Ce processus de fixation conduit à une accumulation des monocytes dans la paroi vasculaire, plus précisément au niveau de l'intima. Cette accumulation des monocytes est aussi facilitée par les LDL modifiées qui déclenchent la sécrétion de chimiokines par les cellules endothéliales et par les cellules musculaires lisses de l'intima. Parmi ces

substances, il y a notamment la MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein-1*) des cellules endothéliales. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que les cellules musculaires lisses peuvent aussi synthétiser et sécréter des médiateurs dans le but de réguler la contraction, le relâchement, l'inflammation, la prolifération, l'apoptose et les altérations de la matrice [58].

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses produisent donc des chimiokines et d'autres substances qui stimulent encore la multiplication des monocytes et les transforment en macrophages, qui est une forme cellulaire plus active. En effet, à mesure qu'ils réagissent aux signaux protéiques émis par les cellules stimulées de l'endothélium et de l'intima, les macrophages se couvrent de récepteurs « éboueurs » (*macrophage scavenger receptors*), plus adaptés pour la capture de LDL modifiées.

Cette capture exagérée des LDL modifiées conduit à la saturation de gouttelettes de graisse au sein des macrophages, d'où le nom donné de « cellules spumeuses » à l'apparence de mousses (*macrophage foam cells*).

Une autre catégorie importante de cellules immunitaires participe également à ce processus athérogénique. Il s'agit des lymphocytes T du sang, qui sont aussi attirés par les molécules adhésives des cellules endothéliales et par les chimiokines des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, pour se rendre dans l'intima.

Par la sécrétion de leurs médiateurs, dont les cytokines, les lymphocytes T renforcent le processus inflammatoire dans la paroi artérielle. Finalement, la présence des macrophages spumeux et des lymphocytes T constitue les stries lipidiques et c'est alors le début de la plaque. Par la suite, la progression ultérieure de cette plaque est rendue possible par les cellules inflammatoires qui permettent la formation d'une chape fibreuse sur le noyau lipidique (*lipid core*), notamment en incitant les cellules musculaires lisses de la média à migrer vers la partie luminale de l'intima, à se multiplier puis à produire une matrice fibreuse pour agglutiner les cellules. Il se constitue dès lors un revêtement, qui certes augmente le volume de la plaque, mais surtout isole la plaque du sang.

I - 3 Angioplastie transluminale percutanée

En 1964, Dotter et Judkins ont réalisé la première angioplastie sur une artère fémorale superficielle utilisant le principe de traverser les lésions sténosantes avec un système de cathéters coaxiaux de diamètres croissants ^[59]. Plus tard en 1970, Porstmann, dans le but de réduire la taille de l'introducteur artérielle, eut l'idée de fixer un ballon en latex à l'extrémité d'un cathéter ^[60]. Finalement, celui à qui revient le mérite d'avoir véritablement développé la technique de l'angioplastie est Andreas Grüntzig qui a utilisé dès 1974 le premier ballon d'angioplastie sur une artère périphérique et réalisé en 1977, la première angioplastie transluminale percutanée chez l'homme ^[61 ; 62]. Actuellement, l'angioplastie est devenue la première technique de revascularisation des cardiopathies ischémiques ^[63]. Par exemple, rien qu'aux États-Unis, les dernières statistiques du rapport 2004 de *l'American Heart Association* et de *l'American Stroke Association* indiquent qu'il y a eu 1 051 000 procédures d'angioplastie pratiquées dont 571 000 correspondent à la pose de stents et 475 000 correspondent à des procédures d'angioplastie transluminale percutanée ^[2].

I - 3.1 Mécanisme de l'angioplastie

L'objectif technique de l'angioplastie transluminale percutanée est de rétablir in situ le diamètre endoluminal, de manière la plus satisfaisante possible, au niveau d'un segment artériel rétréci par la présence d'une plaque d'athérome. Une angioplastie doit amener une rupture de la plaque, autrement dit une dissection et en ce sens, elle est dite réussie si elle réduit la sténose vasculaire d'au moins 50 % sans qu'il y ait de complications post-

opératoires majeures comme un infarctus du myocarde ou une hémorragie à risque, de mortalité ou bien de réinterventions [64].

Selon plusieurs études comparatives entre l'angioplastie et le pontage coronarien, il ne semble pas y avoir de différence significative dans la survenue d'un infarctus du myocarde ou d'une mortalité sur une période post-opératoire d'un an à cinq ans. C'est pourquoi, l'angioplastie semble être une alternative plus intéressante qu'un pontage d'autant plus qu'elle est moins onéreuse et que la période de convalescence du patient est plus courte [65 ; 66]. Malheureusement, la complication chronique majeure suivant une angioplastie est un phénomène de remodelage vasculaire ultérieure, conduisant à un rétrécissement de la lumière artériel, appelé « resténose ».

I - 3.1.1 Dommages morphologiques

La procédure d'angioplastie endommage la paroi artérielle en dénudant la média de l'endothélium vasculaire et en provoquant une rupture de la plaque d'athérome ce qui dissèque en fait la paroi artérielle au niveau de la jonction latérale entre la plaque et la zone saine de l'endothélium. La taille du thrombus, qui se forme alors, est fonction de l'importance de la dissection puisque le degré de dommage occasionné par la procédure d'angioplastie détermine le niveau d'adhésion des plaquettes [67 ; 68].

Les plaquettes sanguines sont des cellules anuclées discoïdes de deux à quatre microns de diamètre. En situation physiologique, leur rôle est de maintenir la circulation normale du sang en permettant la préservation de l'intégrité vasculaire et le contrôle de l'hémorragie après une lésion du vaisseau. Après la procédure d'angioplastie, deux mécanismes majeurs interagissent dans la formation du thrombus : l'activation des plaquettes sanguines et l'activation du système de coagulation. Mais c'est la dénudation de l'endothélium avec la rupture de la plaque qui initie la formation du thrombus, en activant en premier les plaquettes. Puis durant l'athérothrombose, le système plaquettaire

prédomine soutenu par le système de coagulation qui renforce constamment le thrombus en formation. Cette interaction plaquettaire qui est aussi qualifiée d'hémostase primaire aboutit à un thrombus blanc riche en plaquettes lorsque le site de la lésion endothéliale est artériel et aboutit à un thrombus rouge fibrineux riche en fibrine et en globules rouges lorsque le site de lésion endothéliale est veineux [69].

I - 3.1.2 Techniques d'angioplastie

Plusieurs techniques d'angioplastie sont actuellement disponibles : l'angioplastie au ballonnet et les autres techniques ablatives.

La procédure de l'angioplastie au ballonnet consiste à introduire un cathéter guidé dans l'artère fémorale droite et à le conduire jusqu'au niveau de la lésion, généralement au niveau des artères coronaires (par exemple dans l'angioplastie coronarienne). Un guide métallique dirigeable fin, à embout radio-opaque, y est aussi introduit dans le but de franchir la lésion à dilater. Il s'agit d'un point commun à tous les systèmes d'angioplastie car il faut nécessairement franchir la lésion avec un guide pour pouvoir la traiter. Dans le cas de l'angioplastie au ballonnet, un ballon est glissé sur ce guide. Ce ballon de dilatation est amené au niveau de la lésion athérosclérotique puis gonflé progressivement de huit à dix atmosphères, la manœuvre étant plusieurs fois répétée jusqu'à l'élargissement luminal recherché. Comme la pression est appliquée sur toute la circonférence intérieure de l'artère, l'action du ballon agit à la fois sur la lésion athéromateuse et sur les parois saines adjacentes. Au site dilaté, le ballon induit plusieurs actions telles que compression, étirement et fracture, conduisant à une rupture de la plaque avec pour conséquence une dissection sous-intimale et à un étirement des parois saines adjacentes. L'effet abrasif causé par l'action du ballon amène aussi une désendothélialisation de la paroi artérielle, mettant alors les lipides de la plaque rompue en contact avec le milieu sanguin, ce qui induit une activation des systèmes d'hémostase et donc un risque thrombogénique. La

technique du ballonnet d'angioplastie peut être combinée à des techniques de laser, d'ultrasons ou d'angioscopie ^[63]. Les limites majeures de cette technique, en l'absence du recours aux endoprothèses, sont constituées par l'apparition des lésions chroniques, la survenue d'une complication majeure dans environ 1 % des cas, d'une occlusion aiguë dans environ 5 % des cas et enfin par la resténose estimée entre 30 et 50 % des cas ^[63].

D'autres techniques d'angioplastie furent élaborées comme alternatives possibles à l'angioplastie conventionnelle au ballonnet. Ce sont notamment : le laser, l'athérectomie rotative à haute vitesse (Rotablator) et l'athérectomie directionnelle. Bien que ces techniques aient un objectif commun, qui est l'ablation de la plaque, leur impact sur la survenue de la resténose n'est pas suffisamment significatif; c'est pourquoi elles restent encore confinées à quelques indications chirurgicales spécifiques. Par ailleurs, la thérapie photodynamique a été aussi appliquée dans le domaine cardiovasculaire et l'idée de l'utiliser pour traiter les maladies coronaires a permis l'apparition d'une nouvelle méthode d'angioplastie très prometteuse appelée la photoangioplastie. La photoangioplastie semble éviter beaucoup de difficultés liées à l'angioplastie conventionnelle ^[70 ; 71].

I - 4 Resténose post-angioplastie

Les lésions occasionnées par la procédure d'angioplastie induisent plusieurs phénomènes locaux devant permettre la cicatrisation de la paroi artérielle. Comme indiqué par son nom, une resténose signifie une réapparition d'une sténose significative au site artériel dilaté où était antérieurement la lésion athérosclérotique. La resténose est en fait la conséquence pathologique de la cicatrisation de la paroi artérielle.

I - 4.1 Définitions de la resténose

Plusieurs classifications peuvent être utilisées pour appréhender la resténose. Il y a ainsi une classification histologique, une classification clinique, une classification angiographique et une classification échographique. La classification angiographique qui tient compte des résultats obtenus par l'angiographie de l'intérieur du vaisseau au site de la lésion reste une approche limitée quant à l'évaluation des plaques athéroscléreuses [72 ; 73 ; 74 ; 75]. Par contre, la classification échographique qui tient compte des résultats obtenus par échographie endovasculaire à l'aide d'un échographe et des cathéters ultrasonores [76] appréhende mieux la morphologie de la plaque athéroscléreuse car elle réalise des coupes tomographiques de la paroi artérielle en temps réel et à haute résolution [73 ; 77 ; 78].

Finalement, il est actuellement reconnu qu'il y a resténose lorsque la nouvelle sténose apparue est responsable d'une diminution d'au moins 50 % du diamètre de la lumière artérielle [79]. La majorité des resténoses survient dans les six premiers mois suivant l'angioplastie chez l'humain, surtout entre le premier et le troisième mois [79]. Le taux de resténose après angioplastie au ballonnet est d'environ 40 % alors qu'il est proche de 20 % après la mise en place d'une endoprothèse coronaire, encore appelée « stent » [79].

Au niveau mondial, le marché représenté par les stents est évalué à 2,4 milliards de dollars américains dont 60 % serait représenté uniquement par les États-Unis. Ainsi, il y aurait environ un stent et demi par patient ce qui correspondrait à environ 1,8 million de stents posés sur environ 1,1 million de patients [80]. Due à la resténose, le nombre estimé de revascularisation répétée se situe entre 150 000 et 200 000 annuellement dont environ 75 à 80 % pour une angioplastie coronarienne transluminale percutanée et 20 à 25 % pour un pontage coronarien [80]. Le coût total estimé d'une procédure d'angioplastie coronarienne transluminale percutanée se situe entre 6 000 à 12 000 dollars américains et serait malgré

tout 40 % moins onéreux qu'un pontage coronarien [80]. En définitive, l'estimé économique du coût total occasionné par la resténose dépasserait 1,5 milliard de dollars américains [80].

Par ailleurs, un certain nombre de facteurs sont associés à un taux plus élevé de resténose. Le Breton a proposé trois principaux facteurs qui sont ceux reliés au patient, ceux reliés à la lésion ou au vaisseau et ceux reliés à la procédure [79].

I - 4.2 Physiopathologie de la resténose

La resténose post-angioplastie est une pathologie complexe, multifactorielle. La physiopathologie de la resténose associe divers mécanismes [81]: Le retour élastique de la paroi artérielle (*recoil*) et la réparation vasculaire qui comprend la prolifération néo-intimale ou hyperplasie néo-intimale et le remodelage vasculaire. La séquence d'événement dans le développement de la resténose est la suivante [81 ; 82]: le rappel élastique, la formation d'un thrombus puis l'activation et la migration des cellules musculaires lisses de la média. Cette séquence est aussi à rapprocher de celle observée au cours de la réparation tissulaire, suite à un dommage du tissu [83]. La réponse initiale débute dans les minutes suivant l'agression tissulaire et se poursuit environ dix jours. Au cours de cette réponse, plusieurs développements sont observés comme la présence du thrombus, des cellules inflammatoires, des facteurs de croissances. À partir du troisième jour et jusqu'à une période d'un mois, une phase de granulation domine au cours de laquelle il y a prolifération de cellules musculaires lisses qui sécrètent des protéoglycans et du collagène. Le remodelage de la matrice extracellulaire de la néointima, commencé dans la deuxième semaine, se poursuit sur plusieurs mois par des processus de formation et de dégradation de protéoglycans.

I - 4.2.1 Rappel élastique

L'insertion d'un ballonnet dans une artère conduit à dilater cette dernière et augmente le diamètre luminal. Mais, après la procédure d'angioplastie au ballonnet, il se produit un retour élastique de la paroi (*recoil*) qui se traduit par une diminution importante du calibre de la lumière pouvant aller jusqu'à 50 % du gain obtenu initialement ^[84]. Ce rappel élastique est dû aux propriétés élastiques de la paroi artérielle. Il semble que dans le cas des plaques athéroscléreuses excentriques, la portion saine de la paroi artérielle soit plus étirée lors de l'angioplastie au ballonnet ce qui contribuerait alors au rappel élastique ^[85 ; 86]. Le rappel élastique pourrait être considéré comme un facteur indirect dans le développement de la resténose mais pourrait toutefois être minimisé, voire prévenu par la pose d'endoprothèses endovasculaires.

I - 4.2.2 Réparation vasculaire

La réparation vasculaire englobe la prolifération néo-intimale, encore qualifiée hyperplasie néo-intimale, et le remodelage vasculaire.

I - 4.2.2.1 Hyperplasie néo-intimale

Le traumatisme occasionné par l'angioplastie entraîne l'implication des cellules musculaires lisses. Plusieurs phases sont discernées dans cette implication ^[87]:

- L'activation et la prolifération des cellules musculaires lisses de la média,
- La migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima,
- La prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima et la synthèse d'une quantité importante de matrice extracellulaire.

Le résultat aboutit à la formation d'un tissu d'hyperplasie néo-intimale.

I - 4.2.2.1.1 Activation et prolifération des cellules musculaires lisses

L'activation des cellules musculaires lisses est secondaire à la libération locale de plusieurs facteurs dont les plus importants sont des facteurs de croissance comme le PDGF et le bFGF et des cytokines « pro-proliférants » comme l'IL-1 (interleukine-1).

Le **PDGF** est une glycoprotéine présente dans des plaquettes (les granules α) et sécrétée par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses [88]. Le PDGF est aussi exprimé dans les cellules musculaires lisses après le dommage de la paroi vasculaire ou après une stimulation par l'IL-1 (interleukine-1), le TNF, l'angiotensine II ou la thrombine [89]. Il peut induire le chimiotactisme et la prolifération (en synergie avec IGF-1, facteur de croissance insulinoïque-1) des cellules musculaires lisses et des fibroblastes et stimuler la synthèse de matrice extracellulaire et de collagénase [88 ; 89]. Il agit non seulement par chimiotactisme sur les monocytes et les neutrophiles, mais peut aussi en agissant sur les cellules musculaires lisses provoquer la libération de MCP-1 qui est un facteur chimiotactique pour les monocytes [90].

Le **bFGF (facteur de croissance basique des fibroblastes)** est produit par plusieurs types de cellules comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages [91]. Il stimule la prolifération des cellules musculaires lisses, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Le bFGF possède également une action angiogénique [91 ; 92].

Les facteurs de croissance agissent en activant des oncogènes nucléaires comme c-myc, c-fos, et c-myb qui participeraient à la prolifération néo-intimale, en contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire [93 ; 94]. Tous ces facteurs induisent un

changement phénotypique des cellules musculaires lisses les amenant à produire et à sécréter en grande quantité plusieurs substances différentes alors qu'elles possédaient initialement des propriétés plutôt contractiles ^[95].

I - 4.2.2.1.2 Migration des cellules musculaires lisses

La migration des cellules musculaires lisses s'effectue essentiellement sous l'action du PDGF ^[96 ; 97]. La migration des cellules musculaires lisses s'effectue de la média vers l'intima mais une autre origine pourrait être aussi l'adventice de l'artère. Dans leur migration vers l'intima, les cellules musculaires lisses traversent la matrice extracellulaire de la média, riche en laminine, élastine, collagène et protéoglycans et puis traversent la lame élastique interne de l'artère ^[98]. Cette migration est facilitée par divers mécanismes. D'une part, il y a des interactions entre les cellules musculaires lisses et des intégrines présentes dans la matrice notamment des intégrines de la famille des β_1 et de la famille des β_3 (par exemple les intégrines $\alpha_5\beta_3$). Ces interactions résultent généralement en des phénomènes d'adhésion facilitée entre les cellules musculaires lisses et des substances de la matrice comme la fibronectine, la vitronectine, l'ostéopontin, les laminines ^[99 ; 100 ; 101]. D'autre part, il y a des enzymes telles que la plasmine, les protéases à sérine des neutrophiles, comme l'élastase et la cathepsine G et des métalloprotéases comme la collagénase, la gélatinase et la stromélysine ^[102 ; 103 ; 104]. Ces enzymes sont destinées à dégrader des éléments de la matrice extracellulaire. Plusieurs enzymes sont présentes aussi bien dans les cellules musculaires lisses que dans les leucocytes.

I - 4.2.2.1.3 Prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima et synthèse de la matrice extravasculaire

Une fois établies dans l'intima, les cellules musculaires lisses se mettent à proliférer. Cette prolifération s'étend environ sur deux semaines ^[105 ; 106]. Par ailleurs, dans leur migration vers l'intima, les cellules musculaires lisses envahissent également le thrombus formé lors de la procédure d'angioplastie. Il y a production de la matrice extracellulaire qui augmente de volume, contribuant ainsi à la formation du tissu néo-intimal. La production de matrice extracellulaire dans le tissu néo-intimal est sous contrôle de **facteurs de croissances** dont le PDGF et le TGF- β . **Le PDGF** (aussi facteur de croissance dérivé des plaquettes) semble être le facteur stimulant de la prolifération des cellules musculaires lisses dans le tissu néo-intimal. Il serait sécrété par une sous-population de cellules musculaires lisses ^[107]. **Le TGF- β** (TGF- β est le facteur de croissance transformant de type β) est une protéine produite par plusieurs cellules telles que les plaquettes (granules α), les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les leucocytes et les fibroblastes ^[108]. Le TGF- β est activé par la plasmine et la thrombospondine ^[103]. Il régularise la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses ^[109]. Le TGF- β régule aussi la production de la matrice extracellulaire suite au dommage vasculaire par exemple en stimulant la production d'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases ^[103].

Au début, la matrice extracellulaire est riche en protéoglycans notamment en hyaluronan mais finit par s'enrichir de plus en plus en collagène ^[110]. Cette matrice extracellulaire est constituée essentiellement par des protéoglycans ^[110 ; 111 ; 112], des collagènes ^[113 ; 114] qui forment l'essentiel de la matrice extracellulaire du tissu néo-

intimal, de l'élastine ^[115] et des glycoprotéines, dont les principales sont la fibronectine ^[116 ; 117], la thrombospondine ^[118] et l'ostéopontin ^[119 ; 120].

L'évolution du tissu néo-intimal dépend non seulement du contrôle de la production et de la dégradation de la matrice extracellulaire mais aussi de la diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que de la réendothélialisation du tissu néo-intimal. La réendothélialisation du tissu néo-intimal est un processus important car il y a alors, de nouveau, la production de facteurs endothéliaux assurant l'intégrité vasculaire dont le plus important est sans nul doute, le NO. Les cellules endothéliales se mettent aussi à sécréter du sulfate d'héparan qui se rend dans la matrice extracellulaire ^[121]. Cette substance exerce une régulation de l'hyperplasie néo-intimale à plusieurs niveaux, en particulier au niveau des cellules musculaires lisses par action sur leur mitose et sur leur différenciation, en les empêchant d'exprimer un phénotype de producteur ^[122 ; 123], au niveau des facteurs de croissances en les rendant moins disponibles aux cellules musculaires lisses ^[121 ; 124 ; 125] et au niveau de la matrice extracellulaire, en inhibant la production de collagène et d'élastine ^[126]. Les processus d'hyperplasie et de réendothélialisation aboutissent à la formation d'un tissu néo-intimal avec un endothélium, qui ne sont autres que le résultat d'une cicatrisation de la paroi vasculaire.

I - 4.2.2.2 Remodelage vasculaire

Le concept de remodelage vasculaire est un concept récent. Grâce à l'échographie endocoronaire, il a été possible de le mettre en évidence in vivo chez l'homme ^[127]. Le remodelage vasculaire peut être défini comme étant l'ensemble des modifications de la géométrie de la lumière et de la paroi artérielle induites par la dilatation lors de la procédure d'angioplastie et leur évolution dans le temps ^[128]. Le remodelage géométrique du

vaisseau sanguin signifie qu'il y a un changement dans la dimension du vaisseau lui-même [128 ; 129 ; 130] et il peut être qualifié de deux façons : positif ou négatif. **Le remodelage est qualifié de positif**, autrement dit compensateur, lorsqu'il permet de compenser, de manière totale ou partielle, la diminution de la lumière vasculaire, due à la prolifération néo-intimale. **Le remodelage est qualifié de négatif**, autrement dit constricteur, lorsqu'il cause une rétraction de l'ensemble du vaisseau, notamment à partir de l'adventice, amenant ainsi une diminution de la lumière vasculaire.

Selon Glacov et coll. lorsqu'une plaque athérosclérotique augmente de volume au point d'occuper plus de quarante pour cent de la surface délimitée par la lame élastique interne du vaisseau, il se produit alors une augmentation compensatrice de la taille du vaisseau pour maintenir alors la dimension de la lumière vasculaire [74]. Les mécanismes oeuvrant au cours du remodelage vasculaire sont encore mal connus. Cependant, il est fort probable qu'ils fassent appel à des mécanismes divers comme la régulation cellulaire, le contrôle de la production la matrice extracellulaire ou bien l'adaptation de la paroi vasculaire suite à des variations hémodynamiques [131].

La resténose est donc la conséquence à la fois d'un remodelage négatif et d'une prolifération néo-intimale excessive. Le mécanisme prédominant dans l'évaluation de la resténose est observé en fait suivant la technique d'angioplastie pratiquée. Schématiquement, le remodelage vasculaire est le processus prédominant dans le cas de l'angioplastie au ballonnet et des systèmes d'athérectomie. Par contre, la prolifération néo-intimale est prédominante surtout dans le cas des endoprothèses coronaires (resténose intra-stent). Actuellement, il est bien démontré que les endoprothèses coronaires possèdent des effets positifs sur la prévention du remodelage négatif de la paroi artérielle tandis que les procédures uniques d'angioplastie au ballonnet induisent quantitativement plus de prolifération néo-intimale.

I - 4.2.3 Rôle de l'adventice dans la resténose

Suite au dommage occasionné par une procédure d'angioplastie, il y a une activation des fibroblastes de l'adventice qui se différencient en myofibroblastes, riches en myofilaments d'actine [132 ; 133]. Ces myofibroblastes prolifèrent puis migrent vers l'intima. Ces myofibroblastes synthétisent en grande quantité du collagène qui entre dans la composition de la matrice extracellulaire [134]. Plusieurs facteurs peuvent stimuler la prolifération des cellules adventitielles. Ce sont notamment la thrombine, des cytokines, comme IL-1 et TNF, des facteurs de croissance comme le TGF- β qui participerait à la différenciation des fibroblastes adventitiaux [135 ; 136]. Plusieurs auteurs attribuent un rôle significatif à l'adventice dans le remodelage vasculaire. Par exemple, il est possible d'observer un accroissement de la néo-vascularisation adventitielle associée à un épaississement de l'adventice, suite à un dommage vasculaire occasionné par une procédure d'angioplastie coronaire dans un modèle porcin [137 ; 138]. Dans cette même étude, il est aussi montré que cette néovascularisation adventitielle diminue lorsque du collagène se dépose dans l'adventice, contribuant alors à un remodelage négatif du vaisseau. En d'autres termes, une inflammation de l'adventice et la néo-vascularisation adventitielle observée, qui constituent une voie d'entrée pour les leucocytes, supposent l'implication d'un remodelage vasculaire.

I - 5 Stratégies pour la prévention de la resténose

Comme la resténose est la principale limite des interventions de revascularisation par voie endocoronaire, plusieurs stratégies ont été développées dans l'objectif de la prévenir : Les stratégies mécaniques, les stratégies pharmacologiques, les stratégies locales, la thérapie génique et l'irradiation endocoronaire.

I - 5.1 Stratégies mécaniques

La procédure de revascularisation joue un rôle significatif en tant que facteur prédictif de la resténose. Plusieurs recherches pour diminuer le taux de resténose ont été entreprises et ont permis le développement de diverses techniques d'angioplasties. Il s'agit essentiellement du laser, de l'athérectomie rotative à haute vitesse (Rotablator) et de l'athérectomie directionnelle. Cependant, ces nouvelles techniques, qui sont aussi perçues comme des alternatives à l'angioplastie conventionnelle au ballonnet, n'ont guère eu d'impact significatif sur le taux de survenue de la resténose et ne sont plus utilisées que dans quelques indications spécifiques ^[139]. En fait, la seule approche mécanique qui soit véritablement bénéfique par rapport à l'angioplastie au ballonnet en terme de taux de survenue de resténose est l'endoprothèse coronaire, encore appelée *stent*, car elle permet une amélioration des résultats, immédiatement et à plus long terme ^[140 ; 141]. Les endoprothèses coronaires exercent un effet mécanique sur la paroi artérielle car elles la maintiennent en place grâce à la configuration de leur support. Mise en place, elles permettent alors de prévenir le retour élastique de la paroi et contribuent par ce fait à l'obtention de meilleurs résultats en terme d'élargissement de la lumière artérielle.

En effet, deux études importantes, l'étude européenne BENESTENT ^[142] et l'étude nord-américaine STRESS ^[143] ont clairement mis en évidence que la pose d'un stent Palmaz-Schatz permettait de réduire le taux de resténose de l'ordre de 30 %. Plus tard, une étude BENESTENT II plus récente a montré que la pose de stent Palmaz-Schatz hépariné permettait d'avoir un taux de resténose de 16 % dans le groupe des patients stentés versus 31 % chez les patients traités par ballon seul ^[144]. De plus, alors que la survenue de la resténose après angioplastie au ballonnet est de l'ordre de 45 à 60 % suivant les indications, l'implantation de stent endocoronaire entraîne un taux de resténose plus faible puisqu'il est à six mois de l'ordre de 20 à 30 % ^[145]. Les indications des endoprothèses coronaires ont

été bien détaillées par Hamon et Grollier^[146]. Bien que les stents sécurisent les procédures d'angioplasties difficiles par leur propriétés mécaniques, ils limitent aussi le remodelage vasculaire constrictif souvent au prix d'une prolifération néo-intimale plus importante. Cette propriété néo-intimale est le principal mécanisme de la resténose intra-stent^[147].

I - 5.2 Stratégies pharmacologiques

Plusieurs agents pharmacologiques ont été utilisés dans le but d'évaluer leur efficacité sur la survenue de la resténose après angioplastie. Les composés pharmacologiques utilisés peuvent être essentiellement classés selon plusieurs catégories :

- Les anti-plaquettaires.

Compte tenu de la présence du thrombus et de l'implication des plaquettes, observées après une procédure d'angioplastie ainsi que de leurs rôles dans la pathophysiologie de la resténose, il semble judicieux de les évaluer pour la prévention de la resténose. Les principaux exemples d'anti-plaquettaires utilisés sont notamment l'acide acétylsalicylique (aspirine)^[148], des inhibiteurs de la thromboxane A_2 ^[148], les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$ comme l'abciximab^[149] et l'eptifabide (Integrilin)^[150].

- Les anti-coagulants .

Compte tenu de l'importance de la thrombine dans la coagulation, des inhibiteurs de la thrombine, comme l'héparine et l'hirudine, ont été utilisés^[151 ; 152].

- Les anti-inflammatoires.

Compte tenu de la présence d'inflammation lors du dommage vasculaire occasionné après une procédure d'angioplastie, des anti-inflammatoires, notamment de nature non-

stéroïdiennes, comme le tranilast et l'ebesen ont été utilisés [123]. L'utilisation de bloqueur de sélectines a aussi été envisagée [153].

- Les anti-prolifératifs.

Au cours du développement de la resténose, il y a participation de facteurs de croissance comme le PDGF et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE). Il est alors compréhensible d'utiliser des inhibiteurs du PDGF comme le trapidil [154] et des inhibiteurs de l'ACE, comme le cilazapril [155 ; 156 ; 157].

- Les vasodilatateurs.

Lors du dommage de l'endothélium vasculaire occasionné par l'angioplastie, il y a une perte de substances endothéliales assurant la vasodilatation de l'endothélium, c'est pourquoi des vasodilatateurs comme la bradykinine ont été utilisés [158].

- Les hypolipémiants.

Puisque les lipides participent dans le développement de la plaque d'athérome et dans le développement de la resténose, plusieurs hypolipémiants ont été utilisés. Par exemple, comme la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase participe à la synthèse du cholestérol, l'utilisation d'inhibiteur de HMG-CoA réductase, comme le lovastatin, a été employé [159 ; 160]. Un autre hypolipémiant comme le probucol a été utilisé [161 ; 162].

Malgré la diversité des agents pharmacologiques employés et de plusieurs résultats expérimentaux encourageants obtenus chez des modèles animaux, la plupart des essais cliniques se sont traduits par un résultat négatif ou souvent décevant. Plusieurs explications peuvent être avancées comme par exemple d'une part, il y a la différence entre les modèles animaux et humain, notamment au niveau des doses employées et d'autre part, la resténose n'implique pas uniquement que l'hyperplasie néo-intimale mais aussi le remodelage

vasculaire ^[139]. Or la plupart des résultats positifs observés dans des modèles animaux ne l'ont été qu'en terme d'inhibition de la prolifération néo-intimale ^[139].

Toutefois, il semble que des agents pharmacologiques soient actuellement des candidats intéressants au point d'avoir été intégrés dans des endoprothèses à des fins de stratégies de traitement local de la resténose (chapître I-6) ^[163]. C'est le cas principalement du Sirolimus et du Paclitaxel. Le Sirolimus est un antibiotique de la classe des macrolides avec des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives . Il est aussi cytostatique car il agit à la phase G1 du cycle cellulaire ^[164 ; 165]. Quant au Paclitaxel, il est antimitotique et cytostatique. Il agit après la phase G2 du cycle cellulaire et empêche la division cellulaire en bloquant la polymérisation des microtubules durant la phase de mitose ^[164 ; 165]. Le Sirolimus et le Paclitaxel inhibent la prolifération néo-intimale en agissant sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales.

I - 5.2.1 Stratégie pharmacologique développée dans cette recherche

Powell et coll. (1989) avaient montré que le cilazapril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, pouvait inhiber la formation de la néo-intima observée suite à une procédure d'angioplastie au ballonnet ^[155]. Plus tard, d'autres résultats similaires ont été obtenus avec d'autres inhibiteurs de l'ECA dans un modèle d'artère carotide de rat, comme le Captopril ^[166], le ramipril ^[167], le benazeprilat ^[168] et le delapril ^[169]. Les études avec les inhibiteurs de l'ECA ont également été étendues à plusieurs espèces animales mais parfois avec les résultats obtenus étaient variés. Par exemple, il a été trouvé que le cilazapril inhibait la formation de la néo-intima dans le modèle des carotides de cochon de guinée mais pas dans le modèle des artères iliaques de lapins ^[170]. Le modèle porcin a aussi été évalué, à travers des artères coronariennes. Dans ce cas, il a semblé que

ni le cilazapril^[171], ni l'énalapril^[172], ni le trandolapril et ni le Captopril^[173] étaient efficaces. Par ailleurs, le cilazapril était aussi inefficace dans le modèle de babouin^[174]. Des études cliniques chez l'humain ont aussi été entreprises avec le cilazapril (études MERCATOR^[175] et MARCATOR^[176]) et aussi avec le fosinopril^[177] mais elles ne semblaient guères montrer d'effets bénéfiques après une procédure d'angioplastie.

Certes ces résultats ne semblent pas conforter l'hypothèse que l'angiotensine II soit vraiment le médiateur majeur dans la resténose; cependant il n'en demeure pas moins que les inhibiteurs de l'ECA restent des bloqueurs potentiels de la formation de l'angiotensine II pour plusieurs raisons possibles :

- Il existe une possibilité que l'ECA localisée au site de la lésion artérielle soit réfractaire aux doses antihypertensives des inhibiteurs de l'ECA^[178].
- Des voies indépendantes de l'ECA qui mènent à la biosynthèse de l'angiotensine II (par exemple, l'implication des activités des chymases) ont été détectées chez l'humain mais pas dans des artères de rats^[179 ; 180], ce qui renforce la possibilité que l'angiotensine II puisse être formée en quantité suffisante pour persister en présence des inhibiteurs de l'ECA.
- Les inhibiteurs de l'ECA peuvent potentialiser les effets vasodilatateurs de la bradykinine en inhibant sa dégradation dans le modèle de carotide de rat, ce qui correspond à une partie de l'activité inhibitrice sur la prolifération néointimale attribuée aux kinines^[181].

Les principaux récepteurs, qui ont été les plus étudiés, sont les récepteurs AT₁ et AT₂. À titre de rappel, Berry et coll. (2001) ont fourni une bonne récapitulation des données de la littérature sur les récepteurs de l'Angiotensine II, notamment les récepteurs AT₁ et les récepteurs AT₂ ainsi que les effets physiologiques médiés par ces deux récepteurs^[53].

D'autre part, il peut être intéressant de mentionner qu'Allen et coll. (2000) et Zhuo et coll. (1998) ont rapporté que les récepteurs AT_1 sont présents en grande quantité dans les muscles lisses des vaisseaux chez l'humain mais en petite quantité dans l'adventice^[182 ; 183]. Puisque les récepteurs AT_1 de l'angiotensine II possèdent des effets physiologiques vasculaires importants en particulier au niveau de la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et l'expansion de la matrice vasculaire, comme l'indique la Figure I-5.2-1, un des modèles de principe actif proposé était alors le L-158,809 qui est un antagoniste non peptidique sélectif des récepteurs AT_1 de l'angiotensine II.

Physiological effects of AT_1 and AT_2 receptors

AT_1	AT_2
Vasoconstriction	Vasodilation
Cell proliferation	Apoptosis
Cell hypertrophy	Growth inhibition
Antinatriuresis	Natriuresis
Superoxide production	NO production
Endothelin release	Collagen synthesis
Lipid peroxidation	
Adhesion molecule expression	
Vascular matrix expansion	

AT_1 and AT_2 receptors, angiotensin type 1 and 2 receptors; NO, nitric oxide.

Figure I - 5.2-1 Effets physiologiques des récepteurs AT_1 et AT_2 de l'angiotensine II (Tirée de Berry et coll., 2001^[53])

La structure chimique du L-158,809 est présentée dans la Figure I-5.2-2. La pharmacologie du L-158,809 a été étudiée *in vitro*^[184] et *in vivo*^[185]. *In vitro*, le L-158,809 avait montré une grande puissance à inhiber sélectivement les récepteurs AT_1 de

l'angiotensine II dans différents tissus provenant d'espèces animales variées^[184]. Par exemple, *in vitro*, la concentration de l'antagoniste qui inhibe le 50 % de la liaison spécifique (*Inhibitory concentration of 50 %*), notée IC_{50} , s'étendait de 0,2 à 0,8 nM^[184]. En particulier, au niveau de l'aorte de lapin, la IC_{50} du L-158,809 était de 0,3 nM c'est à dire significativement supérieure à celles d'autres antagonistes non peptidiques comme le DuP-753 ou Losartan ($IC_{50} = 54$ nM) et son métabolite EXP3174 ($IC_{50} = 6$ nM)^[184 ; 185].

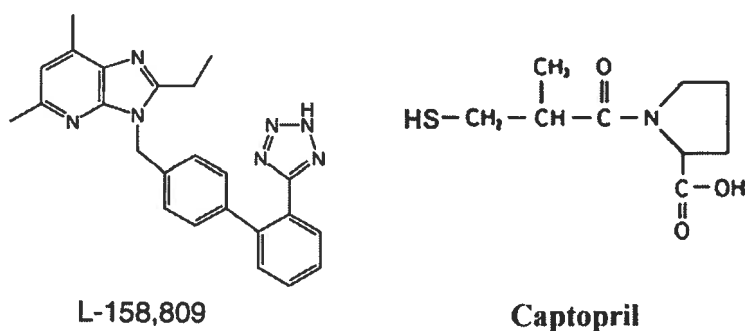


Figure I - 5.2-2 Structure chimique du L-158,809 et du Captopril

In vivo, le L-158,809 inhibe les augmentations de la pression artérielle due à l'angiotensine II^[185]. Chez les rats conscients, la concentration de L-158,809, qui produit le 50 % de son effet maximal et qui est encore appelée *Dose Efficace 50* (DE_{50}) était 29 $\mu\text{g/kg}$ (voie intraveineuse) et 23 $\mu\text{g/kg}$ (voie orale)^[185]. La durée d'action des effets du L-158,809 suite à une seule administration par voie intraveineuse (dose 29 $\mu\text{g/kg}$) ou par voie orale (23 $\mu\text{g/kg}$) dépassait six heures chez le rat^[185]. De plus, au niveau des rats et des singes, les effets pharmacologiques du L-158,809 semblaient 10 à 100 fois supérieures à ceux du

DuP-753 (Losartan) et approximativement 3 fois supérieures à ceux au métabolite EXP3174^[185]. Enfin, la pharmacocinétique du L-158,809 a été étudiée par Colleti et Krieter (1994) chez les rats mâles et chez les singes rhésus femelles. Ainsi, chez les rats, la demie-vie plasmatique du L-158,809 était 7,6 heures \pm 3,1 heures et sa clairance plasmatique était 45,5 \pm 15,9 mL/h/kg et son volume de distribution à l'équilibre était 0,37 \pm 0,11 L/kg^[186]. Dans ces deux espèces, le L-158,809 était excrété dans l'urine et les fèces^[186].

Pour espérer obtenir le maximum d'inhibition de la prolifération néo-intimale chez des rats dont la carotide a subi une angioplastie au ballonnet, un second modèle de principe actif a été aussi proposé conjointement au L-158,809. Il s'agissait du Captopril qui est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I et dont la structure chimique est présentée dans la Figure I-5.2-2. En effet, outre la diminution de la biosynthèse de l'angiotensine II, une inhibition de l'ECA devrait contribuer aussi à l'accumulation de la bradykinine qui est une substance vasodilatatrice. C'est pourquoi lors de cette étude, il a semblé intéressant de vérifier si le Captopril pouvait potentialiser les effets pharmacologiques du L-158,809, dans le cas d'une bimédication réunissant le L-158,809 et le Captopril.

I - 5.3 Nouvelles stratégies

Des nouvelles stratégies tentent de cibler plus précisément le site de lésion de la resténose. En effet, le fait de vouloir traiter par voie systémique une pathologie, qui se déroule à un endroit précis dans une artère, par exemple une artère coronaire, est apparu rapidement inapproprié. C'est pourquoi plusieurs stratégies de traitements locales de la resténose après angioplastie, en particulier au niveau de la paroi artérielle, ont été élaborées. Deux niveaux importants de traitement local ont été abordés au niveau de la paroi artérielle, en particulier par la lumière artérielle (mode endovasculaire) et par l'adventice (mode

périvasculaire). Deux procédés semblent alors s'opposer : le premier consiste à utiliser un cathéter permettant d'injecter le médicament directement dans la paroi au moment de l'angioplastie alors que le second consiste à enrober un stent d'un système matriciel pour libérer de manière soutenue un agent thérapeutique, au site de la lésion.

La thérapie génique consiste à introduire un gène au niveau des cellules cibles, notamment au niveau du noyau cellulaire afin de le faire exprimer. Ce gène contient les séquences qui codent pour l'acide ribonucléique messager (ARNm) d'une protéine régulatrice. Ainsi, le fait de faire exprimer le nouveau gène introduit, par la cellule hôte, revient à produire la protéine régulatrice. Dans ce cas, cette protéine régulatrice est la plupart du temps l'agent thérapeutique. La thérapie génique constitue actuellement une nouvelle approche dans le traitement de la resténose ^[187]. Plusieurs axes de recherches sont actuellement en cours dans le domaine de la resténose après angioplastie, dont quatre stratégies essentielles ^[188] : La stratégie visant la prolifération cellulaire, la stratégie visant la migration cellulaire, la stratégie antithrombotique et la stratégie visant la réendothélialisation. Les caractéristiques des principaux vecteurs utilisés pour le transfert de gène ont été détaillées dans l'article de Baek et March (1998) ^[188]. Ces mêmes vecteurs peuvent être aussi utilisés dans le domaine des maladies cardiovasculaire en général ^[189 ; 190]. Utilisés pour le traitement de la resténose, ces principaux vecteurs sont essentiellement ^[188] les vecteurs viraux (les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés), les vecteurs non viraux (les plasmides à acide désoxyribonucléique (ADN), les oligonucléotides). Mais malgré quelques résultats encourageant ^[189 ; 190 ; 191 ; 192 ; 193 ; 194], les travaux par thérapie génique, appliqués aux maladies cardiovasculaires et en particulier à la resténose, restent encore au stade de la recherche et n'ont pas encore, sous toute réserve, d'application clinique.

L'idée d'appliquer la radiothérapie pour le traitement de la resténose a aussi été retenue dans la mesure où les mécanismes physiopathologiques de la resténose après angioplastie, comme la réaction de prolifération et de migration des cellules musculaires lisses, la production importante de la matrice extracellulaire, essentiellement du collagène, et le remodelage vasculaire avec sa composante rétractile possible, peuvent être rapprochés de ceux impliqués dans les réactions de cicatrisation cutanée. En effet, l'irradiation à faible dose, depuis longtemps, a été utilisée pour prévenir la formation de cicatrices chéloïdes [139]. Comme les travaux expérimentaux sur l'irradiation endocoronaire ont montré des résultats encourageant, quant à la réduction de la prolifération néo-intimale dépendant de la dose, après dommage vasculaire par angioplastie, plusieurs essais thérapeutiques ont donc été entrepris chez l'homme. Plusieurs résultats obtenus semblent indiquer la possibilité d'obtenir un taux de resténose très bas sans complication significative [195 ; 196]. En fait, il semble que la radiothérapie vasculaire soit la première thérapie dans le traitement de la resténose qui ait été prouvé comme étant effective cliniquement [197]. Cependant, plusieurs paramètres restent encore à établir comme la dose optimale et les catégories d'isotope possible pour les différents types de systèmes de radiothérapie à destinées cliniques.

I - 6 Stratégies de traitement local de la resténose

Plusieurs arguments plaident en faveur des traitements locaux de la resténose :

- La resténose après angioplastie est une réponse locale située sur un site bien limité du réseau coronarien et est focalisée au niveau de la paroi endoluminale artérielle,
- Le site artériel où se développe la resténose est déterminé par l'angioplastie initiale,
- Ce site de lésion est accessible par voie percutanée permettant ainsi la possibilité d'un traitement local par la voie endoluminale.

- La connaissance précise du site de lésion ainsi que la compréhension tardive d'une participation de l'adventice artérielle aux mécanismes physiopathologiques, qui régissent la resténose, ont contribué au développement d'une nouvelle stratégie de traitement locale par la voie périvasculaire.

Toutefois, la prévention de la resténose par les thérapies locales implique la connaissance de plusieurs paramètres :

- Une application et une administration optimales en vue de limiter les risques de pertes systémiques et les effets secondaires
- Une biocompatibilité des matériaux mis en contact avec la paroi artérielle,
- Toute action de thérapie locale devrait garantir la plus grande innocuité pour la paroi artérielle,
- Une durée d'action suffisante des agents thérapeutiques utilisés,
- Une bonne identification des cibles cellulaires et moléculaires, oeuvrant dans le développement de la resténose.

Au niveau des stratégies locales, il existe deux voies d'accès par lesquelles l'administration des agents thérapeutiques peut être possible pour le traitement de la resténose : la voie endoluminale et la voie périvasculaire.

I - 6.1 Administration endoluminale

La connaissance précise du site de lésion permet sans aucun doute l'usage de la voie percutanée. De plus, la possibilité d'administrer un principe actif, en même temps qu'une procédure d'angioplastie effectuée au niveau de l'artère, contribue à limiter considérablement les manœuvres chirurgicales invasives. Lorsque les conditions dictant la thérapie locale sont satisfaites, il est possible de procéder par la voie intraluminale. Il est possible de classer les systèmes à administration intraluminale en trois catégories : les

recouvrements luminaux polymériques, les cathéters à ballons et les prothèses endocoronaires ou stents, polymériques ou en métal avec enrobage.

De plus, en combinaison avec ces procédés, il est aussi possible d'utiliser la technologie des systèmes particuliers, de nature polymérique, comme les microsphères, dans le but de contrôler la libération des agents thérapeutiques ^[198].

I - 6.1.1 Recouvrements luminaux

Puisque la pathogenèse de la resténose implique l'activation des plaquettes sanguines, des facteurs de croissances et des cytokines d'origine plasmatique et plaquettaire, l'isolation de la paroi vasculaire, endommagée, du milieu sanguin devrait alors réduire la resténose ^[198]. Sur la base de cette hypothèse, l'approche de recouvrements luminaux a été entreprise. Les matériaux qui composent ces recouvrements peuvent être des hydrogels photopolymérisables ^[199 ; 200], de la colle de fibrine ^[201] ou du polytétrafluoroéthylène enrobé de colle de fibrine ^[202]. Tant que l'endothélium vasculaire endommagé reste isolé du sang, la plupart des études indiquent une réduction de la prolifération néo-intimale. La possibilité d'incorporer un agent thérapeutique dans les recouvrements luminaux a aussi été évaluée ^[202 ; 203 ; 204].

I - 6.1.2 Cathéters à ballons

Au niveau de la thérapie endovasculaire, il existe trois catégories de systèmes, dont l'action est à court terme, qui permettent la délivrance locale d'agents thérapeutiques : les systèmes passifs, les systèmes actifs et les systèmes d'injection directe. Ces systèmes ont été remarquablement bien décrits et illustrés par Brasselet et coll. (1999) ^[147].

I - 6.1.3 Endoprothèses artérielles, polymériques et à enrobage polymérique

Le rôle des endoprothèses coronaires a été traité en partie au chapitre I – 5.1.

A court terme, les stents sécurisent et améliorent les résultats par leurs propriétés mécaniques, notamment dans le cas des procédures d'angioplasties difficiles. À moyen terme, ils démontrent un intérêt partiel sur la prévention de la resténose car ils limitent le remodelage vasculaire constrictif au prix d'une prolifération néo-intimale plus importante, principal mécanisme de la resténose intra-stent^[147].

Bien que le développement des stents dans le traitement de la resténose soit une avancée majeure, la resténose intra-stent constitue à elle seule une nouvelle forme de pathologie. Plusieurs approches tentent actuellement de traiter ce type particulier de resténose mais aucune des techniques interventionnelles percutanées ne résout à ce jour de manière parfaitement satisfaisante les problèmes de la resténose après angioplastie ou de l'implantation d'un stent. C'est pourquoi, l'espoir se tourne vers l'essor de traitements préventifs, à visée purement antiproliférative, comme la radiothérapie, la thérapie génique et surtout les stents polymériques et les stents métalliques à enrobage polymérique.

En effet, l'idée d'enrober les endoprothèses vasculaires d'un matériel polymérique contenant une substance thérapeutique apparaît intéressante pour administrer des médicaments localement suite au déploiement de l'implant. Bien que l'enrobage par un polymère contribue déjà à augmenter la biocompatibilité des stents métalliques, la possibilité d'apporter un aspect biomimétique à cet enrobage l'améliore encore plus. L'exemple classique d'un enrobage biomimétique de stent est celui par la phosphorylcholine qui est un phospholipide hydrophile, constituant normal de la membrane cellulaire. Par ailleurs, l'intérêt majeur d'un enrobage polymérique contenant un agent thérapeutique est de pouvoir libérer ce dernier de manière soutenue directement au site de lésion.

Puisque le fait d'implanter des stents métalliques peut être compliqué par des phénomènes de thromboses et de resténoses, plusieurs études ont alors montré qu'il est possible d'utiliser des stents, non plus métalliques mais polymériques afin d'augmenter la

biocompatibilité. Peng et coll. (1996) ^[205] ainsi que Bertrand et coll. (1998) ^[206] ont notamment répertorié les principaux polymères, qui ont été évalués pour constituer des stents polymériques expansibles. Par ailleurs, le fait de pouvoir contrôler les procédures de polymérisation en sélectionnant notamment les unités monomériques adéquatement donne la possibilité d'avoir des propriétés particulières, par exemple des caractéristiques de surfaces plus lisses et des forces mécaniques suffisantes. De plus, les stents polymériques s'adaptent bien contre la paroi vasculaire, contribuant par le fait même à diminuer l'hyperplasie néo-intimale ^[205]. Selon la stabilité des matériaux polymériques employés sous des conditions physiologiques, les stents polymériques sont définis en deux catégories ^[205]: Les stents polymériques biostables, qui maintiennent l'intégrité de l'artère et les stents polymériques biodégradables, qui se dégradent en substances non toxiques. Cependant, beaucoup de stents polymériques semblent toutefois donner une réaction inflammatoire plus marquée ^[207]. En incorporant des agents thérapeutiques à l'intérieur de ces polymères, il est alors possible d'obtenir une libération de ces substances au site même de la lésion afin de pouvoir inhiber ainsi la prolifération néo-intimale.

Une autre possibilité est d'utiliser des stents métalliques qui possèdent un enrobage polymérique. L'intérêt d'utiliser un stent métallique, réside dans la possibilité d'avoir une variété de géométries possibles (spirales, tube quadrillé, hélicoïdale, mèche tubulaire, mèche filamentée, mèche cylindrique). La géométrie des endoprothèses est un facteur qui influence l'écoulement sanguin. Plusieurs compositions de matériaux métalliques entrent dans la composition de ces implants comme par exemple l'acier inoxydable 316L à faible teneur en carbone, le nitinol, le tantalum, l'or ou un mélange de platine et d'iridium ^[208]. Mais, les stents métalliques ne sont pas une panacée universelle car ils présentent deux principaux désavantages ^[209]. Le premier est un problème de biocompatibilité et de thrombogénicité car la surface des métaux, chargée négativement, contribue à l'attraction d'éléments sanguins, comme les plaquettes, chargés positivement pouvant amener la formation de thrombose. Le second est un problème d'oxydation et de corrosion, qui

libère dans le milieu environnant des oxydes et des ions métalliques avec action inflammatoire. C'est pourquoi, afin de remédier à ces désavantages, plusieurs recherches s'orientent vers le développement de stents métalliques enrobés par des polymères biocompatibles. Plusieurs auteurs tels que Peng et coll. (1996) ^[205], Bertrand et coll. (1998) ^[206] et Gunn et coll. (1999) ^[207] ont répertorié et présenté les principaux polymères, qui ont été évalués pour l'enrobage de stents comme par exemple l'acide poly-(L)-lactique, la polycaprolactone et l'acide polyglycolique.

En incorporant des agents thérapeutiques à l'intérieur du réseau de ces polymères, il est alors possible d'obtenir une libération de ces substances au site même de la lésion afin de pouvoir inhiber ainsi la prolifération néo-intimale et prévenir la resténose intra-stent ^[210]. Les endoprothèses intégrant des agents pharmacologiques sont appelées « endoprothèses actives » par opposition aux endoprothèses sans agents pharmacologiques appelées « endoprothèses passives ». Actuellement, les principales endoprothèses actives disponibles peuvent libérer localement le sirolimus ou le paclitaxel ^[163]. Cependant plusieurs problèmes restent encore à résoudre dans le cas des endoprothèses actives comme l'effet à long terme, l'effet de bord et l'effet de mal apposition ^[165].

I - 6.1.4 Systèmes particuliers

Lorsque des agents thérapeutiques sont délivrés par voie intraluminale localement, ils possèdent généralement une clairance trop rapide. C'est pourquoi, des systèmes de libération soutenue ont été élaborés dans le but d'augmenter la durée d'action locale des substances actives ^[147]. Les systèmes de libération contrôlée, en cours d'évaluation, sont essentiellement : les microparticules comme les microsphères et les nanoparticules comme les nanosphères et les liposomes. Mais la plupart du temps, la présence de ces particules au niveau de la paroi vasculaire entraîne des réactions inflammatoires. Les systèmes

particulaires peuvent être incorporés dans les recouvrements luminaux, les cathéters à ballons et dans les endoprothèses coronaires.

I - 6.2 Administration périvasculaire

Il est bien connu que les thérapies utilisant des systèmes à libération soutenue au niveau local offrent plusieurs avantages sur les thérapies dans lesquelles les médicaments sont administrés par voie orale ou par voie intraveineuse. Ainsi, l'implantation des systèmes polymériques à libération soutenue au site de lésion offre notamment les avantages suivants :

- La libération du médicament est locale, au site même où se développe la resténose,
- La concentration délivrée de médicament est élevée localement,
- L'action du médicament est toujours optimale au site de lésion,
- La survenue d'effets secondaires est grandement minimisée par rapport à une administration systémique.

De plus, l'utilisation des matrices polymériques à libération contrôlée permet aussi l'évaluation de nouveaux principes actifs qui seraient normalement trop rapidement dégradés s'ils étaient administrés de manière systémique.

L'administration périvasculaire constitue de ce fait une méthode intéressante d'aborder l'évaluation de principes actifs dans le traitement de la resténose puisque l'adventice y joue un rôle significatif^[211]. Le principe guidant ce choix d'administration repose sur le fait que l'agent actif déposé en périphérie de l'artère, dans la région ciblée, au niveau de l'adventice, diffusera de manière passive au travers de la paroi vasculaire. De plus, la présence du *vasa vasorum* nourricier, autour de l'artère devrait également faciliter cette diffusion. Enfin, cette méthode est facilement reproductible compte tenu de la facilité d'accès, moyennant une chirurgie. Toutefois, par son caractère invasive, il est évidemment difficile d'utiliser cette voie d'administration, en même temps qu'une procédure d'angioplastie percutanée. L'administration d'agents thérapeutiques est s'effectuée au

niveau périvasculaire à partir de deux types de systèmes : Les implants polymériques et les systèmes particuliers.

I - 6.2.1 Implants polymériques

Les implants polymériques utilisés au niveau périvasculaire se présentent sous la forme de films. La formulation du médicament qui permet de le libérer de façon contrôlée est présentée soit sous forme d'un système matriciel ou soit sous forme d'un système réservoir. Parmi les polymères qui ont été utilisés lors d'études sur la libération périvasculaire de médicaments, les plus courants sont les copolymères d'éthylène vinyle acétate, les alcools polyvinyliques et les alginates.

Le groupe de Mayberg a été le premier à évaluer la libération périvasculaire adventicielle d'héparine comme possibilité d'inhiber la thrombose et la prolifération néo-intimale [212]. Golomb et coll. (1994) citent quelques agents thérapeutiques qui ont servi à évaluer la voie d'administration par l'adventice. Il s'agit notamment des substances suivantes [211] : l'héparine, l'hirulog (un inhibiteur de la thrombine), la dexaméthasone et les oligonucléotides antisens. Dans les traitements de la resténose, les études consacrées à la libération périvasculaire adventicielle de substances thérapeutiques sont moins nombreuses que celles de la voie d'administration intraluminale.

Voici quelques études consacrées à la voie d'administration périvasculaire :

- Okada et coll. (1988) ont utilisé un implant à base d'alcool polyvinylique contenant de l'héparine dans leur étude [212].
- Golomb et coll. (1996) ont montré que la libération de tyrphostin AG-17 à partir d'un implant d'éthylènevinyle acétate inhibe la prolifération néo-intimale dans des modèles d'artères de rats ayant subi une angioplastie [213].
- Dans l'étude de Nugent et coll. (1999), les auteurs se sont servis de films d'alginate comportant de l'héparine microencapsulée dans du poly(D,L-lactate/glycolate),

comme moyen de contrôle pour étudier les effets biologiques de l'implantation périvasculaire de gels abritant des cellules endothéliales chez des modèles de cochons et de bœufs ^[214]. Ces auteurs ont remarqué aussi que la libération périvasculaire d'héparine n'avait pas d'effet sur la resténose.

- Edelman et coll. (2000) ont également utilisé dans leur étude des films d'alginate ayant de l'héparine microencapsulée dans du poly(D,L-lactate/glycolate) ^[215].
- Plus récemment, l'étude de Signore et coll. (2001) a montré que la libération de paclitaxel (le composé actif du taxol), qui est un antimitotique, à partir d'implants à base d'éthylène vinyle acétate ou à base de polycaprolactone permet d'obtenir une inhibition complète de la prolifération néo-intimale ^[216].

En fait, selon les conclusions d'une étude du groupe de Edelman (1997), portant sur la diffusion directe de l'héparine, à partir de gel de poloxamer, implanté en périvasculaire, au niveau de l'adventice, il y aurait très peu de substance active à atteindre l'espace endovasculaire car une grande partie empruntent le réseau de capillaires extravasculaires (*vasa vasorum*) ^[217]. Toutefois, la voie périvasculaire demeure intéressante car lorsque des cellules endothéliales étaient implantées en périvasculaire, le même groupe a réussi à montrer qu'il était possible d'obtenir une inhibition de l'hyperplasie intimale dans des modèles de cochons ^[214 ; 218].

I - 6.2.2 Systèmes polymériques particuliers

Utiliser l'adventice comme voie d'entrée pour aborder le traitement de la resténose est un concept récent. Le nombre peu élevé d'études attestent cette réalité. Ainsi, il y a aussi très peu d'étude, qui utilisent des systèmes polymériques particuliers, telles que les microsphères, pour libérer des agents thérapeutiques au niveau de l'adventice. La seule

étude récente est celle de Wong et coll. (2001) qui utilisent des microsphères contenant du IGF-1 (facteur de croissance de l'insuline et facteur chémoattractif pour les cellules musculaires lisses) implantées au niveau périvasculaire dans le but de réduire la prolifération néo-intimale ^[219]. Dans ce même article, les auteurs montrent qu'il serait possible d'empêcher la réduction de la lumière artérielle en attirant les cellules musculaires lisses loin de celle-ci, au moyen du facteur attractif IGF-1 et empêcher ainsi la prolifération néo-intimale.

I - 7 Productions et caractérisations des vecteurs micro particulaires

La production et la caractérisation des vecteurs micro-particulaires forment une partie importante du champ des technologies pharmaceutiques.

I - 7.1 Concepts de base de la libération contrôlée

Le manque de respect dans la compliance journalière des médicaments peut conduire à d'importantes oscillations de leurs concentrations plasmatiques entre la zone toxique et la zone non thérapeutique. Ces risques peuvent être réduits en utilisant des formes galéniques où la libération du principe actif est ralentie. Il s'agit des formes galéniques à libération contrôlée, voire prolongée ou soutenue.

I - 7.1.1 Formes à libération contrôlée et classification des systèmes polymériques à libération contrôlée

Il existe plusieurs terminologies visant à classifier les formes à libération contrôlée. Mais toute classification reste toutefois arbitraire c'est pourquoi il convient de définir au mieux les termes employés. Ainsi, le terme « libération » se rapporte aux formes galéniques, en fonction d'études *in vitro*, alors que la désignation « action » se rapporte davantage à une notion pharmacocinétique, *in vivo*, en référence aux concentrations plasmatiques. L'article de Ségot-Chicq et coll.^[220] présente, de manière remarquable et avec élégance, une classification basée sur celle de Buri : Les formes à action retardée ou différée, les formes à action répétée, les formes à action prolongée et les formes à action soutenue. Avec l'importance que prennent les polymères dans le développement de la technologie pharmaceutique, Ségot-Chicq et coll. ont également, par une approche synthétique, établi une classification intéressante des systèmes basée sur le mécanisme contrôlant la libération du principe actif^[220] : Les systèmes à diffusion contrôlée, les systèmes chimiquement contrôlés, les systèmes actifs par pénétration de solvant et les systèmes activés par ondes magnétiques ou ultrasoniques. Dans le cas des systèmes à diffusion contrôlée, il peut exister deux modes de diffusion, une diffusion intermoléculaire ou une diffusion à l'intérieur du réseau de pores, c'est pourquoi deux catégories de formulations peuvent alors être proposées : les systèmes réservoirs et les systèmes matriciels.

I - 7.1.1.1 Systèmes réservoirs

Les systèmes réservoirs présentent la caractéristique de posséder une enveloppe, de nature polymérique, qui en entourant le principe actif, permet ainsi le contrôle de sa libération. L'enveloppe polymérique peut également être un film de nature gonflante ou

non. Quant au principe actif, il peut être présent soit à l'état solide, soit dans une solution, soit dans une suspension ou encore soit dispersé parmi d'autres excipients solides.

La Figure I - 7.1-1 illustre la diffusion à travers un système réservoir. Parmi ces systèmes, il est possible d'y inclure plusieurs formes galéniques telles que les systèmes à membranes, les macrocapsules, les microcapsules. Par exemples, les membranes polymériques, employées dans les systèmes réservoirs, sont généralement : des silicones, des hydrogels, de l'éthyl-cellulose, de l'acétate de cellulose, des poly éthylène vinyl acétates. Les films polymériques sont habituellement homogènes, de préférence non poreux mais il en existe toutefois qui sont micro-cristallines et microporeuses.

Les systèmes réservoirs possèdent l'avantage d'assurer une libération d'ordre zéro. Par contre, ils ne sont généralement pas biodégradables et donc impliquent un retrait lorsqu'ils sont implantés. Bien entendu, la libération d'ordre zéro du médicament reste possible tant que le réservoir est saturé en principe actif, autrement dit la qualification d'ordre zéro demeure limitée seulement pour une période de temps défini.

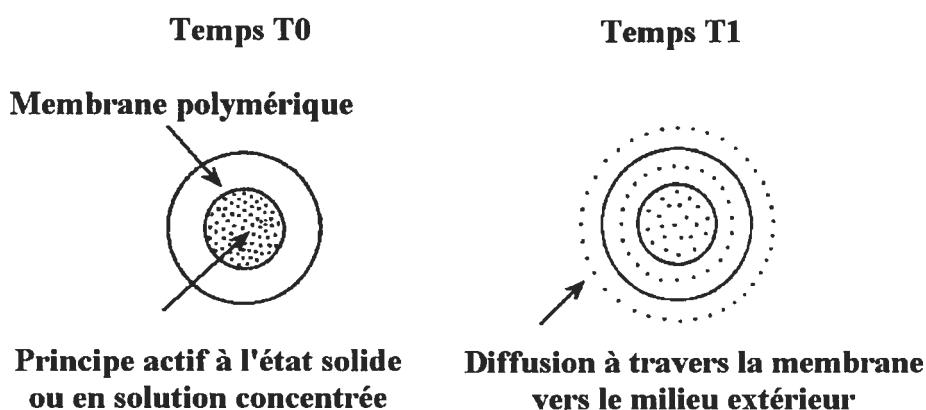


Figure I - 7.1-1 Schéma de principe d'une section d'un système réservoir à diffusion contrôlée (Tirée de Ségot-Chicq et coll., 1985) ^[220].

De plus, un bris de ce type système peut entraîner des conséquences néfastes puisqu'une dose importante de principe actif se trouve alors déversée hors du réservoir. Enfin, le coût de fabrication de ces systèmes reste encore élevé, en raison de la difficulté à contrôler et à garantir parfaitement la libération d'ordre zéro, du principe actif.

I - 7.1.1.2 Systèmes matriciels

Les systèmes matriciels contiennent un principe actif qui possède la particularité d'être réparti de manière uniforme au sein du polymère solide. Au fur et à mesure que le liquide de dissolution progresse dans le système, il dissout le principe actif, qui diffuse alors vers l'extérieur en empruntant le réseau poreux ou encore les espaces intermoléculaires de la matrice polymérique. Ainsi le facteur limitant la vitesse de libération du principe actif demeure principalement la diffusion de ce dernier au travers de la matrice polymérique. La Figure I - 7.1-2. représente la diffusion contrôlée à travers un système matriciel.

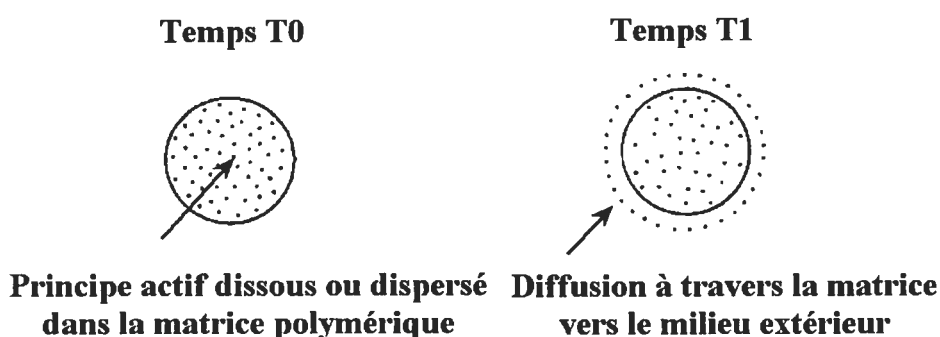


Figure I - 7.1-2 Schéma de principe d'un système matriciel à diffusion contrôlée (Tirée de Ségot-Chicq et coll., 1985) ^[220].

Ces systèmes sont généralement faciles à fabriquer, de coût raisonnable. Par contre, il n'est pas possible d'obtenir une libération d'ordre zéro du principe actif, avec ces systèmes. Ces systèmes sont appréciés généralement, pour une utilisation orale, sous la forme de comprimé, car ils permettent une libération prolongée du médicament.

I - 7.1.2 Mécanismes de libération des principes actifs

Le transfert par diffusion d'un soluté de principe actif dans un polymère peut être sous l'influence de deux mécanismes. Le premier mécanisme concerne la diffusion suite à la solubilisation. Selon ce mécanisme, il y a d'abord solubilisation du soluté dans le polymère puis sa diffusion entre les segments de chaînes macromoléculaires du polymère. Ce mécanisme porte aussi le nom de mécanisme de partage. Le second mécanisme concerne la diffusion du soluté dans des pores du système polymérique. En d'autres termes, il implique un transfert du principe actif dans le liquide qui remplit le réseau de pores. La taille du soluté joue un rôle dans le cas du mécanisme de diffusion dans les pores mais moins dans le cas du mécanisme de partage. Il est entendu que les deux mécanismes peuvent également agir ensemble ou bien que l'un ou l'autre prédomine, selon la morphologie structurelle du système polymérique. Le mécanisme, qui préside la diffusion des principes actifs dans les matrices de polymère, est dit de nature fickienne et s'appuie sur les deux lois de Fick ^[220 ; 221].

Première loi de Fick :
$$J = -D \frac{dc}{dx}$$

- Où :
- J** est le flux de matière (en mole ou g / (cm² . sec))
 - D** est le coefficient de diffusion (en cm² / sec) dans le milieu considéré.
 - c** est la concentration de la substance qui diffuse (en mole ou g / cm³)

x est la distance de diffusion (en cm)

$\frac{dc}{dx}$ est le gradient de concentration en principe actif, dans la zone de diffusion, entre deux points distants de **dx**.

La première loi se rapporte à la diffusion en régime constant ou stationnaire et décrit le transfert de masse à travers une couche de polymère. L'hypothèse de départ suppose que le système soit dans un état thermodynamique idéal, que le coefficient de diffusion soit indépendant de la concentration et que la diffusion soit unidirectionnelle.

Le signe négatif veut dire que le flux s'exerce en sens inverse du gradient.

Le flux de matière, **J**, représente en fait la vitesse de transfert d'une masse de soluté

$$\frac{dM_t}{dt} \text{ à travers une surface } S : J = \frac{dM_t}{S \cdot dt}$$

Où : $\frac{dM_t}{dt}$ est la vitesse de diffusion de la substance, dans la zone

de diffusion, dans un intervalle de temps de **dt** (en mole ou g / sec)

S est le plan de surface au travers duquel diffuse la substance (en cm²)

Dans les systèmes réservoirs, le gradient de concentration est constant alors que dans les systèmes matriciels, il varie avec le temps puisque la distance de diffusion grandit continuellement à mesure que le soluté diffuse ^[221].

Deuxième loi de Fick :
$$\frac{\partial c}{\partial x} = -D \frac{\partial^2 c}{\partial^2 x}$$

Où : **D** est le coefficient de diffusion (en cm² / sec)

c est la concentration de la substance qui diffuse (en mole ou g / cm³)

x est la distance de diffusion (en cm)

$\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$ est la dérivée par rapport à x , du gradient de concentration en principe actif, dans la zone de diffusion, entre deux points distants de dx .

$\frac{\partial c}{\partial x}$ est le gradient de concentration en principe actif, dans la zone de diffusion, entre deux points distants de dx .

La deuxième loi de Fick décrit un régime de diffusion transitoire, autrement dit non stationnaire, dans lequel la concentration varie au cours du temps. Cette seconde équation signifie que la vitesse de changement de concentration par rapport au temps t (en sec), à une distance x , est proportionnelle à la vitesse de changement du gradient de concentration à ce niveau.

Le coefficient de diffusion D est un paramètre inhérent au principe actif et représente sa diffusibilité à une température donnée et dans un milieu donné. Il est sous la dépendance de facteurs topologiques [221]. De plus, il dépend aussi de la nature du polymère. En effet, la diffusibilité est élevée dans le cas de polymère, à l'état caoutchouteux, comme les élastomères de silicone ou le caoutchouc naturel, pouvant être de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} cm^2/sec . Par contre, dans le cas des polymères à l'état vitreux, comme le polystyrène, la diffusibilité est faible, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-12} cm^2/sec [221].

Par ailleurs, l'incidence de la taille du principe actif reste encore variable selon le milieu de diffusion, compte tenu de l'orientation des chaînes macromoléculaires des polymères, néanmoins lorsque les solutés sont de faible dimension, ils diffusent plus rapidement que s'ils sont de grande dimension.

Il faut distinguer les deux cas : les systèmes réservoirs et les systèmes matriciels.

I - 7.1.2.1 Systèmes réservoirs

Pour illustration, il convient de considérer l'exemple d'un réservoir de principe actif entouré d'une membrane polymérique, qui règle la diffusion. À partir de la première loi de Fick, il est possible d'obtenir l'équation suivante :

$$J = \frac{dM_t}{S \cdot dt} = D \cdot \frac{[(K_1 \cdot C_D) - (K_2 \cdot C_L)]}{L}$$

- Où :
- C_D est la concentration dans le compartiment donneur, qui est le réservoir
 - C_L est la concentration dans le compartiment récepteur, qui est le milieu d'élution
 - L est l'épaisseur de la membrane
 - D est le coefficient de diffusion du soluté dans la membrane. Il est aussi le coefficient de diffusion effectif, expérimentalement observé.
 - K_1 est le coefficient de partage du principe actif dans le réservoir
 - K_2 est le coefficient de partage du principe actif dans le milieu d'élution

Lorsque le liquide qui remplit le réservoir est de même nature que celui qui est dans le milieu d'élution, en l'occurrence l'eau, alors $K_1 = K_2$. L'équation devient :

$$J = \frac{dM_t}{S \cdot dt} = D \cdot K \cdot \frac{\Delta C}{L}$$

De plus, dans la mesure où les études de libération du principe actif sont de préférence réalisées, en condition « sink », c'est à dire dans un milieu de libération où la concentration finale en principe actif libéré ne dépasse pas les quinze pour cent de la valeur de la solubilité, alors C_L est négligable.

D'où la nouvelle équation :

$$J = \frac{dM_t}{S \cdot dt} = D \cdot K \cdot \frac{C_D}{L}$$

Où : **K** est le coefficient de partage du principe actif dans l'eau

L'intégration de l'équation permet d'obtenir :

$$M_t = \frac{S \cdot D \cdot K \cdot \Delta C}{L} \cdot t \quad \text{encore notée :} \quad M_t = \frac{S \cdot D \cdot K \cdot C_D}{L} \cdot t$$

Où : M_t est la quantité cumulée libérée au temps **t** de diffusion

$$P = \frac{D \cdot K}{L} \quad \text{est la perméabilité (en cm / sec)}$$

Il existe plusieurs modélisations mathématiques, portant sur la libération d'un principe actif, en fonction de différentes configurations du système réservoir, comme les films, les cylindres et les sphères ^[221].

I - 7.1.2.2 Systèmes matriciels

Dans ces systèmes, le principe actif est uniformément distribué dans la matrice polymérique, soit dissous ou soit dispersé. La distance de diffusion du soluté n'est pas constante au cours du temps, mais s'accroît continuellement avec la libération du principe actif. La zone d'éluion s'accroît donc continuellement. Les modélisations des cinétiques de libération du médicament hors de ces systèmes sont obtenues à partir de la seconde équation de Fick. Par ailleurs, il est possible de distinguer plusieurs catégories de matrices. Il y a d'une part les systèmes matriciels homogènes, qui ne contiennent pas de pores et pour lesquels la diffusion du principe actif se produit dans la matrice polymérique et d'autre part les systèmes matriciels hétérogènes, avec des particules de polymères, imperméables au

soluté, qui sont traversées de canalicules et pour lesquels la libération du médicament a lieu par dissolution directe du principe actif solide dans le solvant, dans les pores. Les solutions mathématiques qui président à la modélisation des cinétiques de libération du principe actif à partir de ces systèmes sont généralement complexes. Il y a également une forte dépendance de la forme géométrique du système.

De manière simplifiée et dans le cas d'un mécanisme de diffusion fickienne, il est possible de modéliser la libération du principe actif à partir de systèmes matriciels, pour des

valeurs de $0 < \frac{M_t}{M_\infty} < 0,6$, sous la forme de l'équation : $\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^{(0,5)}$

Où : $\frac{M_t}{M_\infty}$ est la fraction de principe actif, libérée au cours du temps t .

M_t est la quantité de principe actif libérée au cours du temps t .

M_∞ est la quantité de principe actif libérée à un temps infini, autrement dit de la quantité totale de principe actif, incorporée dans le système.

k est un coefficient variant selon la nature du système, comme la géométrie et la solubilité du principe actif.

Par dérivation de cette équation, la vitesse de libération du médicament, par unité de

surface A , peut être obtenue : $\frac{dM_t}{A \cdot dt} = \frac{k \cdot M_\infty}{2 \cdot A} \cdot t^{(-0,5)}$

Dans la mesure où il est possible de rencontrer des mécanismes de diffusion non fickienne, comme par exemple dans le cas de matrices hydrophiles gonflantes, une équation plus générale dans la modélisation de la cinétique de libération du principe actif à partir de

systèmes matriciels a été proposée [222]: $\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$

Où : n est le paramètre qui définit l'ordre de la cinétique de libération du principe actif. Par dérivation de cette équation globale, le taux de libération du médicament, par unité de surface A , peut aussi être obtenu :

$$\frac{dM_t}{A \cdot dt} = n \cdot C_0 \cdot k \cdot t^{(n-1)}$$

Où : C_0 est la charge en principe actif dans le système matriciel (en g/cm²)

A est la surface (en cm²)

k est un coefficient variant selon la nature du système, comme la géométrie et la solubilité du principe actif.

L'ordre de la cinétique de libération du médicament est déterminé par le paramètre n (Tableau 1-7.1-1). Il est alors possible de classer le déplacement du médicament dans les systèmes matriciels selon trois modes de transport^[222 ; 223] : Le transport fickien ou de type I, le transport de type III (non fickien) ou anomal, le transport de type II et le transport de super type II. **Le transport fickien ou de type I** est observé lorsque le principe actif est incorporé dans des polymères à l'état caoutchouteux. Dans cet état, les chaînes macromoléculaires du polymère sont flexibles et la diffusion des molécules de solvant est négligeable par rapport à la relaxation des chaînes macromoléculaire du polymère. **Le transport de type II** est observé lorsque le principe actif est présent dans des polymères à l'état vitreux. Dans cet état, les chaînes macromoléculaires du polymère ne sont pas flexibles et la diffusion des molécules de solvant n'est plus négligeable par rapport à la relaxation des chaînes macromoléculaires, qui est faible. Le solvant, qui progresse, à grande vitesse (**super type II**) ou avec une cinétique d'ordre zéro (**type II**), délimite ainsi une zone hydratée et une zone non hydratée au sein du polymère. **Le transport de type III** est observé lorsque le principe actif est présent dans des polymères dont la relaxation des chaînes macromoléculaires du polymère et la diffusion des molécules de solvant sont

de même ordre de grandeur. Il s'agit d'une diffusion non fickienne, qui porte le nom de diffusion anormale.

Valeur de n	Mode de transport	Vitesse de diffusion $\left(\frac{dM_t}{dt} \right)$
0.5	Diffusion fickienne ou de type I	Fonction de $t^{(-1/2)}$
$0.5 < n < 1$	Transport anormal ou de type III	Fonction de $t^{(n-1)}$
1	Transport de type II	Constante Cinétique d'ordre zéro
$n > 1$	Transport de super type II	Fonction de $t^{(n-1)}$

Tableau I - 7.1-1 Valeurs de n et interprétation des mécanismes de libération diffusionnelle à partir des données de libération de médicament des films polymériques (Adaptée de Peppas, 1985 ^[222])

I - 7.2 Les microparticules

Parmi les objectifs du développement pharmaceutique d'un médicament, la démarche d'accroître l'efficacité et la spécificité d'action du principe actif, en l'associant à un vecteur approprié, est une étape importante. Outre l'amélioration du tropisme pour la cible visée, le passage par un vecteur pharmaceutique permet, non seulement, de mieux apprécier les concentrations, nécessaires et suffisantes, en médicament à appliquer au

niveau de la cible choisie, mais aussi d'en diminuer les doses, et éviter ainsi le risque d'un possible débordement toxique.

Les potentialités d'application des vecteurs pharmaceutiques sont alors variées et les plus intéressantes demeurent les suivantes :

- La protection contre l'inactivation, chimique, enzymatique ou immunologique, du principe actif, entre le site d'administration et le site de l'action pharmacologique.
- L'amélioration du transport du principe actif, par un moyen plus approprié, jusqu'au site de la cible choisie.
- L'accroissement de la spécificité d'action, par la possibilité d'employer de manière sélective un principe actif avec une dose plus faible, plus appropriée et plus efficace.
- La baisse de la toxicité du principe actif, par modification de sa dose et de sa distribution tissulaire.

Il existe plusieurs classes de vecteurs pharmaceutiques dont les principales sont les liposomes, les nanoparticules, les micelles, les microsphères et les nanosphères.

Les microparticules sont des particules solides qui ont une taille comprise entre 1 micron et 1000 microns. Bien que le terme « microsphère » fasse allusion à l'aspect morphologique de la microparticule en lui conférant le qualificatif « sphérique », il est aussi possible de réserver ce terme, par choix sémantique, pour une autre désignation à fins de classification. Ainsi, lorsque les microparticules sont classifiées selon leur structure, il est possible de distinguer deux types différents :

- Les microcapsules.

Les microcapsules sont des microparticules, dont le centre, soit solide ou soit liquide, qui contient un principe actif, est entouré d'une membrane. Cette membrane, de nature polymérique, constitue le principal facteur limitant de la libération du médicament. La configuration propre des microparticules les place dans la catégorie des systèmes réservoirs.

- Les microsphères (proprement dite)

Les microsphères peuvent être définies comme des micromatrices polymériques dans lesquelles le principe actif est uniformément dispersé, c'est à dire à l'état de particules ou d'agglomérats, et/ou dissous, c'est à dire à l'état moléculaire, dans le réseau des chaînes macromoléculaires. Le réseau matriciel qui forme les microsphères peut être constitué d'un ou de plusieurs polymères.

Cependant dans la littérature, il peut apparaître parfois une confusion entre ces deux dénominations en particulier lorsque les microparticules contiennent un principe actif dispersé sous la forme de cristaux dans la matrice polymérique. Dès lors, il appartient à l'auteur de bien définir sa préférence sémantique et d'attribuer à ces microparticules, la dénomination de « microcapsules multinucléaires » ou de « microsphères hétérogènes » [224 ; 225]. C'est pourquoi afin d'éviter toute confusion, la dénomination préférentielle adoptée dans le présent ouvrage sera la seconde, « microsphères hétérogènes ».

I - 7.3 La microencapsulation par nébulisation

Plusieurs méthodes existent pour obtenir des microparticules et procéder à la microencapsulation d'un principe actif ou d'une substance comme par exemple la fusion à chaud, la coacervation, l'emploi de fluide supercritique, l'émulsification ou évaporation de solvant et le séchage par nébulisation ou « spray-drying ». La méthode utilisée dans cette recherche était le séchage par nébulisation ou « spray-drying ». Il s'agit d'une méthode de microencapsulation largement employée dans l'industrie alimentaire, chimique, et pharmaceutique. Rapide et fiable, cette technique a été adoptée, dans le cadre de cette étude, pour produire des microsphères au moyen du nébuliseur Mini Spray Dryer BÜCHI 190 dont le principe de fonctionnement (identique à celui du BÜCHI B-191) est illustré dans la Figure I - 7.3-1. Le fonctionnement du Mini Spray Dryer fait référence au principe de l'atomisation par buse (encore appelée gicleur) en courant parallèle, c'est à dire que le produit atomisé et l'air de dessiccation s'écoulent dans la même direction. La poudre

homogène sèche, obtenue rapidement à l'aide de la dessiccation par atomisation dans le nébuliseur, est beaucoup moins hygroscopique qu'avec la lyophilisation [226].

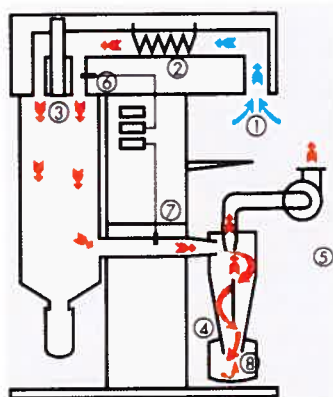


Figure 9A

Légende :

- 1 Orifice d'aspiration
- 2 Chauffage
- 3 Entrée du flux stabilisé dans la chambre de séchage
- 4 Cyclone où s'effectue la séparation entre le produit et l'air
- 5 Aspirateur
- 6 Sonde thermique à l'entrée d'air
- 7 Sonde thermique à la sortie d'air
- 8 Récepteur pour produit fini

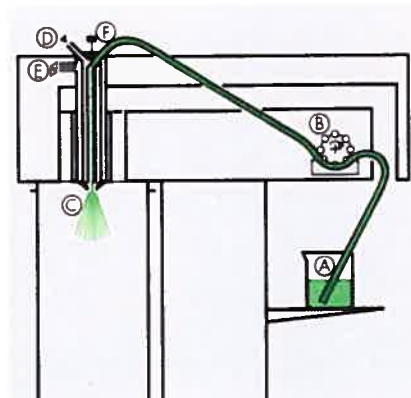


Figure 9B

Légende :

- A Solution, émulsion ou dispersion du produit
- B Pompe péristaltique d'alimentation
- C Canal du produit
- D Raccordement pour air comprimé ou gaz inerte
- E Raccordement de l'eau de refroidissement
- F Pointeau avec canal rainuré
Le pointeau sert à déboucher le gicleur si le produit l'obstrue

Figure I - 7.3-1 Schéma du principe de fonctionnement du nébuliseur mini Spray Dryer BÜCHI B-191 (Figure 9A) et schéma de l'écoulement du produit et du gicleur de pulvérisation (Figure 9B). (Tirée du pamphlet publicitaire de la compagnie BÜCHI Laboratoriums-Technik AG [226] et du manuel d'utilisateur du Mini Spray Dryer BÜCHI 190 [227]).

Généralement dans le domaine bio-pharmaceutique, les polymères qui servent pour la microencapsulation par nébulisation, de principe actif, sont biodégradables. Giunchedi et Conte ont dressé une liste, certes non exhaustive, de polymères couramment utilisés dans la microencapsulation par nébulisation. Ces polymères appartiennent à différentes familles

telles que la cellulose, les éthers, les polymères acryliques, les polyvinylpyrrolidones, les résines et les lipides. Dans la présente étude, l'acide polylactique ou polylactate (PLA) et l'acide polyglycolique ou polyglycolate (PGA) ont été essentiellement utilisés.

I - 7.3.1 Polyglycolate et polylactate

Le polyglycolate (*poly(glycolic acid)* ou PGA) et le polylactate (*poly(lactic acid)* ou PLA) sont des polyesters linéaires biodégradables. Le PGA résulte de la polymérisation du monomère glycolide tandis que le PLA résulte de la polymérisation du monomère lactide (Figure I - 7.3-2) ^[228]. Les copolymères de ces produits portent le nom de poly(lactate-co-glycolate) ou PLG ou poly(glycolate-co-lactate) ou PGL.

Le PGA est un polymère cristallin biodégradable dont le point de fusion se situe autour de 225°C et la température de transition vitreuse (*glass temperature* ou *Tg*) est autour de 35°C. La chaleur de fusion d'un PGA entièrement cristallin (100 %) est de 45.7 cal/g ^[228]. La formule chimique du PGA montre qu'il y a répétition d'un groupe méthylène non polaire et d'un groupe ester relativement polaire. Aussi, le PGA se dégrade par hydrolyse du groupe ester. Le temps de dégradation du PGA est de l'ordre de quelques semaines, dépendamment non seulement de ses propriétés physico-chimiques (le poids moléculaire, le degré de cristallinité) et des caractéristiques géométriques de l'échantillon ainsi que des conditions physico-chimiques de l'environnement, comme le pH et la température ^[228].

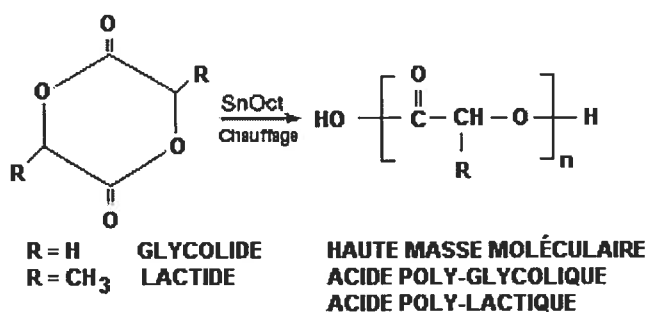


Figure I - 7.3-2 Polymérisation de l'acide poly-glycolique, de l'acide poly-lactique et de leurs copolymères. (Tirée et adaptée de Perrin et English, 1997 ^[228]).

Le PLA présente des caractéristiques chimiques, physiques et mécaniques très différents du PGA à cause de la présence du groupement méthyle dans l'unité de répétition. La présence d'un carbone asymétrique explique la chiralité du PLA. Le L-PLA est un polymère cristallin ayant un point de fusion autour de 175°C et une Tg autour de 65°C. La chaleur de fusion, rapportée par Fisher et coll., pour un produit entièrement (100 %) cristallin est 93.7 J/g. Le D-PLA, contrairement au L-PLA, est complètement amorphe avec une Tg autour de 57°C ^[228]. Puisque le D-PLA est moins cristallin que le L-PLA, il se dégrade plus vite que ce dernier car pour les polyesters semi-cristallin, la dégradation apparaît d'abord dans les zones amorphes puis ensuite dans les zones cristallines ^[229]. Par ailleurs, il faut noter que durant le processus de dégradation, la cristallinité du polymère semi-cristallin augmente graduellement amenant le matériau à devenir plus cristallin ce qui le rend plus résistant à l'hydrolyse qu'à l'origine. Cet accroissement de cristallinité serait attribué à une mobilité accrue des chaînes partiellement dégradées qui peuvent alors se réaligner et se réarranger en un état cristallin, plus ordonné ^[229]. Ce phénomène montre les effets possibles qui pourraient survenir suite à des traitements ultérieurs appliqués sur le polymère, comme par exemple la trempe ou la chauffe ^[229].

Quant aux copolymères de lactate et de glycolate, ils sont également sujets à la dégradation, généralement plus rapide que dans le cas des homopolymères (PLA et PGA) car la polymérisation réduit la cristallinité du polymère et la rend aussi plus susceptible à l'humidité [228]. De manière générale, il existe différents facteurs, qui affectent la susceptibilité à la dégradation des polyesters biodégradables et ils ont été bien répertoriés par Anderson et coll. [229]. Il est à noter qu'une distribution plus large du poids moléculaire, indiquant la présence d'un plus grand nombre de groupements carboxyliques terminaux, faciliterait la dégradation auto-catalytique des chaînes du polymère [229]. De manière similaire, la porosité joue un rôle majeur dans la dégradation du système polymérique puisque la présence de pores accélère la dégradation, notamment en améliorant la diffusion d'oligomère et en rendant plus accessible des bouts de chaînes carboxyliques terminaux à la dégradation [229].

Les PLA, les PGA et leurs copolymères PGL semblent être biocompatibles dans les tissus mous, chez l'animal et chez l'humain [228]. Les produits de dégradation du PGA et du PLA sont des molécules déjà métabolisées par l'organisme puisque le produit de dégradation du PGA est l'acide glycolique et celui du PLA est l'acide lactique. Actuellement, les polymères et copolymères de PLA et de PGA ont plusieurs domaines d'application comme par exemple la régénération tissulaire, la substitution pour les greffes d'os et la libération de médicament [228]. Les PLA et les PGA sont aussi souvent employés comme matériaux pour outils de vectorisation microparticulaire. Il est intéressant aussi de noter que les microsphères de tailles supérieures à cinq ou dix microns en diamètres peuvent ne pas être phagocytées par les macrophages. Par contre, lorsque leur taille est inférieure à cinq microns, le risque, que des microsphères soient en dessous du seuil de la phagocytose, est plus grand puisqu'elles peuvent être plus rapidement hydrolysées [229]. De plus, des études ont montré que la présence de polyéthylène glycol

(PEG) à la surface des microsphères contribuent à rendre ces derniers furtifs en regard des éléments sanguins et des macrophages. C'est pourquoi, l'incorporation de PEG dans la formulation des microsphères serait recommandée en vue d'allonger le temps de circulation du vecteur dans le sang, autrement dit sa demi-vie sanguine. L'explication de ce phénomène pourrait être expliquée par le fait que les chaînes hydrophiles de PEG constitueraient une couche protectrice autour de la microsphère, à fins de prévention des interactions éventuelles avec des protéines, présentes dans le sang et présentes à la surface des cellules sanguines^[230].

I - 7.4 Caractérisations *in vitro* des microparticules

Dans l'étape de caractérisation des microsphères, une attention particulière sera apportée à l'analyse géométrique, l'analyse structurale interne et l'analyse chimique de surface puisqu'elles ont été préférentiellement employées dans cette présente recherche.

I - 7.4.1 Analyse géométrique

L'analyse géométrique vise à évaluer les paramètres suivants la forme et la taille des microsphères. Dépendamment de l'instrumentation et de la méthodologie, il est parfois possible d'obtenir ces deux paramètres à partir d'une seule expérience.

I - 7.4.1.1 Analyse de la taille

Les méthodes pour caractériser la taille des particules sont nombreuses^[231 ; 232].

Il y a d'une part les méthodes optiques comme les analyses par microscopies (microscopie électronique), les techniques de diffusion de la lumière (*light scattering*) et l'analyse par

rayons X et d'autre part les méthodes dites mécaniques comme l'analyse par tamis (*sieve analysis*). Mais il y a aussi les méthodes d'analyses de la taille des pores (souvent associées aux méthodes d'analyse fractale). La spectroscopie par corrélation de photon (*Photon Correlation Spectroscopy ou PCS*) a été employée dans cette recherche.

I - 7.4.1.1.1 Spectroscopie par corrélation de photon

La spectroscopie par corrélation de photon est une méthode optique de diffusion de la lumière qui permet de mesurer la taille de très petites particules. Il s'agit de mesurer le coefficient de diffusion de la particule dans un médium liquide, par exemple l'eau, et de calculer leur diamètre sphérique équivalent. La technique nécessite de mesurer les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée à un angle fixé. Ces fluctuations trouvent leur origine dans le mouvement Brownien, qui provoque le mouvement diffusionnel des particules dans et hors du champ de mesure. Puisque les grandes particules diffusent plus lentement que les petites, les fluctuations en intensité lumineuse diffusée à partir des grandes particules apparaissent donc sur une échelle de temps plus longue que les fluctuations induites par les petites particules. Alternativement, plus les particules sont petites, plus elles diffusent rapidement et par conséquent les fluctuations en intensité lumineuse diffusée, qui leur correspondent, sont rapides. Dès lors, les variations temporelles en intensité lumineuse diffusée contiennent donc l'information qui pourrait permettre d'obtenir le coefficient de diffusion des particules dans le médium considéré. Une fois le coefficient de diffusion connu, le diamètre sphérique diffusionnel équivalent peut être trouvé au moyen de l'équation de Stokes-Einstein ^[232 ; 233]. Ainsi, par la détermination des propriétés statistiques des fluctuations de la lumière diffusée (*correlation function* ou *noise spectrum*), il devient possible de calculer la taille des particules ^[232]. La spectroscopie de corrélation de photon est une méthode non-invasive, rapide et très précise lorsque les échantillons sont monodispersés. Mais quand les échantillons sont

polydispersés, l'analyse devient plus délicate car l'instrument doit effectuer une détection simultanée de toutes les catégories de tailles des particules. De plus, lorsque dans l'échantillon, la distribution de la taille des particules est large, les particules plus grosses ont tendance alors à augmenter la valeur moyenne de la taille par rapport à la moyenne réelle. Par ailleurs, toute propriété particulière (par exemple la charge, la présence d'une couche de surface diffuse) affecte la mesure de la taille puisque la technique repose en partie sur le mouvement Brownien. Mais, il faut reconnaître que la principale difficulté dans cette technique est d'arriver à extraire le plus précisément les distributions de la taille des particules, au moyen d'un logiciel adéquat^[232].

I - 7.4.1.2 Analyse morphologique

L'analyse morphologique vise à obtenir les caractéristiques de la forme des microsphères préparées. À ce jour, il existe très peu d'applications de la microscopie à force atomique (AFM) en pharmacie. C'est pourquoi, la présente recherche essaie d'appliquer les méthodologies de l'AFM au secteur pharmaceutique.

I - 7.4.1.2.1 Microscopie à force atomique

De tous les outils d'imagerie, les microscopes à champ proches ou SPM (*Scanning Probes Microscopes* ou *SPMs*) sont une famille d'instrument qui permettent d'évaluer au moyen d'une sonde pointue, très fine, à champ proche, les caractéristiques des surfaces des matériaux à de très hautes résolutions et en trois dimensions^[234]. Les SPMs sont les seules microscopes qui permettent d'obtenir les plus grands grossissements et les meilleures résolutions^[235]. La première technologie à champ proche, à être mise au point, a été la microscopie à effet tunnel ou STM (*Scanning Tunneling Microscopy* ou

STM) [236 ; 237 ; 238 ; 239]. Elle reste encore reconnue pour permettre d'obtenir la meilleure résolution atomique à l'heure actuelle [235]. La STM a été en fait développée en 1982 par Binnig, Rohrer, Gerber et Weibel à la compagnie IBM de Zurich (Suisse) [236]. Binnig et Rohrer ont remporté le prix Nobel de physique pour cette invention en 1986. Mais, la principale limitation de cette technique est que la surface de l'échantillon et la sonde soient de bons conducteurs du courant électrique [239]. C'est pourquoi, cette limitation importante a conduit en 1986 au développement de la microscopie à force atomique ou AFM (*Atomic Force Microscopy* ou *AFM*) par Binnig, Quate et Gerber ainsi que par une collaboration fructueuse entre IBM et l'université Standford (USA).

Comme la STM, l'AFM emploie également une sonde pointue, très fine, pour explorer et évaluer la surface des matériaux. Toutefois, le principal intérêt est que l'AFM ne nécessite pas de mesurer un courant entre l'échantillon et la sonde. Par conséquent, il n'est pas nécessaire que l'échantillon, ou sa surface, soit un conducteur du courant électrique. L'AFM est aussi appelée SFM pour *Scanning Force Microscopy*.

En AFM, il y a trois modes principaux d'exploration des surfaces des échantillons : le mode contact, le mode non-contact et le mode contact-intermittent, encore dit Tapping™.

Brièvement, pour comprendre les mécanismes qui régissent l'AFM, il faut se souvenir des événements qui surviennent durant l'interaction entre deux atomes.

Entre deux atomes, il peut se manifester deux catégories d'interactions. Il y a d'une part des forces de répulsion entre leurs nuages électroniques et entre leurs noyaux, qui portent des charges de même signe et d'autre part, il y a des forces d'attraction entre les électrons de l'un et le noyau de l'autre, qui portent des charges de signe contraire. Lorsque les deux atomes se rapprochent, il se manifeste au début une force d'attraction entre eux car l'attraction l'emporte sur la répulsion. Les deux atomes s'attirent en fait mutuellement au fur et à mesure qu'ils se rapprochent l'un de l'autre. Puis lorsque la distance entre les deux noyaux devient très petite, de l'ordre du angström (à ce niveau les nuages électroniques des deux atomes se chevauchent), la situation s'inverse et il se produit alors une répulsion qui tend à augmenter à mesure que les deux noyaux se rapprochent. Entre les deux situations,

attraction et répulsion, il existe une position d'équilibre c'est à dire qu'il y a une distance où les deux effets se compensent et s'annulent. Il est possible aux deux atomes d'osciller autour de leur distance d'équilibre mais ils y sont toujours ramenés.

L'AFM opère de façon similaire autrement dit l'AFM mesure les forces qui apparaissent entre la surface de l'échantillon et la sonde. Le microscope à force atomique explore la surface de l'échantillon à l'aide d'une sonde pointue (*tip*), fixée à l'extrémité libre, externe, d'une lame-support flexible (*cantilever*). La sonde est de l'ordre de quelques microns de longueur avec moins de cent angströms de diamètre alors que la lame-support est de l'ordre de cent à deux cent micromètres de longueur. Les forces entre la sonde et la surface de l'échantillon induisent une courbure ou une déflexion de la lame-support, qui est mesurée par détecteur. Les déflexions mesurées permettent de générer la topographie de la surface de l'échantillon.

La Figure I - 7.4-1 représente la courbe de la force inter-atomique entre des atomes de la sonde et des atomes de la surface de l'échantillon. Elle image la courbe de la force, calculée à partir des déflexions de la lame-support de la sonde, en fonction du déplacement (équivalent à la distance inter-atomique) du bloc moteur-piezo-électrique en régime cyclique. Quand la sonde se rapproche de l'échantillon, une force attractive peut être mesurée. Au fur et à mesure de l'avancée du bloc moteur-piezo, l'apex de la sonde vient de plus en plus en contact avec la surface de l'échantillon et l'interaction nette devient alors répulsive. La Figure I - 7.4-1 illustre aussi trois modes d'exploration : Le mode contact, le mode non contact et le mode contact-intermittent. Dans le mode contact, la lame-support est maintenue à quelques angströms de la surface de l'échantillon et la force inter-atomique entre la sonde et l'échantillon est de nature répulsive. Par contre, dans le mode non contact, la sonde est maintenue à une distance de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines d'angströms de la surface de l'échantillon. La force inter-atomique entre la sonde et l'échantillon est alors de nature attractive. Quant au mode intermittent ou Tapping™ (pour la compagnie Digital Instrument), il se situe entre les deux modes, contact et non contact. Les forces en jeu dépendent de plusieurs facteurs : la nature de l'échantillon, la distance entre l'échantillon et la sonde, la géométrie de la sonde, la constante du ressort de la sonde et les éventuelles contaminations présentes sur la surface de l'échantillon. Les forces

rencontrées [240] par une sonde SPM quand elle approche une surface sont des forces d'adhésion, des forces de friction, des forces électrostatiques, des forces de tension de surface du fluide, des forces de Van Der Waals et des forces ioniques de répulsion ou forces de Coulomb.

Dans le mode contact, la sonde demeure en contact avec la surface de l'échantillon, via une couche de fluide adsorbée sur cette surface alors que dans le mode non contact, la sonde ne touche pas la surface de l'échantillon mais oscille au-dessus de la couche de fluide adsorbée sur la surface.

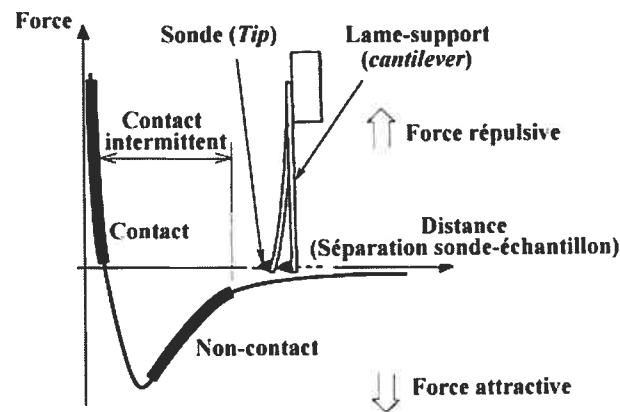


Figure I - 7.4-1 Courbe de la force inter-atomique en fonction de la distance. (Adaptée de Howland et Benatar, 1993-1996, [241] et de De Stefanis et Tomlinson, 2001 [242]).

Par contre dans le mode contact-intermittent ou TappingTM, la lame-support oscille proche de sa fréquence de résonance, avec une amplitude allant de 20 nm à 100 nm. La sonde touche très légèrement la surface de l'échantillon de façon intermittente. Un mécanisme de rétroaction maintient une amplitude oscillatoire constante, en maintenant un RMS (*Root Mean Square* ou *RMS*) du signal oscillatoire (détecté par la photodiode) constant [243]. Le maintien constant de l'amplitude oscillatoire permet une interaction

constante entre la sonde et l'échantillon (toujours selon le mode contact intermittent) ^[243]. La Figure I - 7.4-2 illustre de manière très schématique le mode contact intermittent ou mode Tapping™ ^[243]. Le mode Tapping™ peut s'effectuer aussi bien dans l'air ambiant qu'en milieu liquide. Dans le cadre de cette étude, le mode Tapping™ a été choisie préférentiellement car il se prête mieux à l'évaluation de microsphères polymériques, qui sont des matériaux mous (*soft*) au lieu de dur (*hard*) comme les métaux ^[243]. De plus l'option imagerie de phase ou Phase Imaging™ confère au mode Tapping™, une supériorité indéniable (Figure I - 7.4-3). Ainsi il est possible d'obtenir au niveau de l'échantillon, une cartographie topographique des variations des propriétés de sa surface, comme par exemple des propriétés viscoélastiques, de friction, d'adhésion et de composition ^[244]. La lame-support est excitée près de sa fréquence de résonance et l'amplitude oscillatoire est utilisée comme un signal rétroactif pour mesurer les variations topographiques de l'échantillon. Puis le retard de phase de l'oscillation de la lame-support, par rapport au signal envoyé au moteur piezo-électrique est simultanément enregistré ^[244]. Ce retard de phase est très sensible aux variations des propriétés de l'échantillon comme sa viscoélasticité et son caractère adhésif.

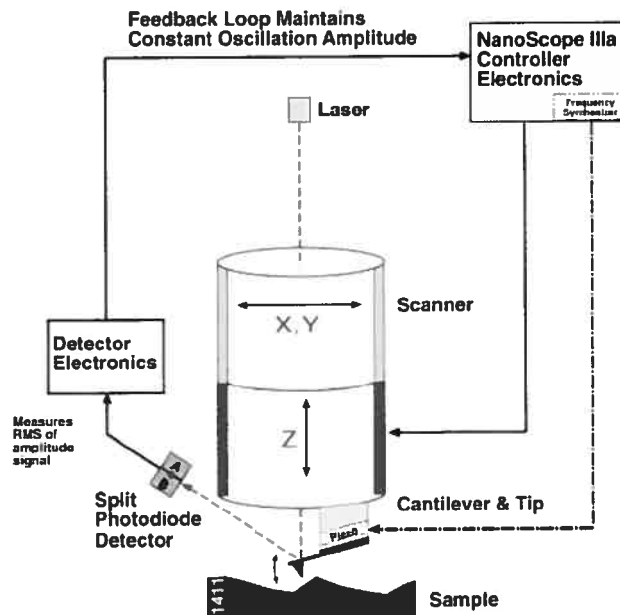


Figure I - 7.4-2 Schéma du mode contact intermittent ou mode Tapping™. (Tirée de Digital Instrument, 2000 ^[243]).

Encore très peu utilisée à cause de son prix relativement élevé, l'AFM suscite néanmoins de l'intérêt. Les applications de l'AFM sont relativement variées. Elles concernent essentiellement le domaine de l'imagerie de différents matériaux, notamment dans l'étude de l'état solide et l'étude des polymères. Sa grande résolution et le fait que son utilisation ne nécessite pas obligatoirement de traiter les échantillons, l'amène à être utilisé aussi dans le domaine de la biologie, notamment dans la visualisation des structures des cellules des organismes vivants, des protéines et dans l'étude du génome des cellules. Son application dans le domaine pharmaceutique reste encore à l'état embryonnaire.

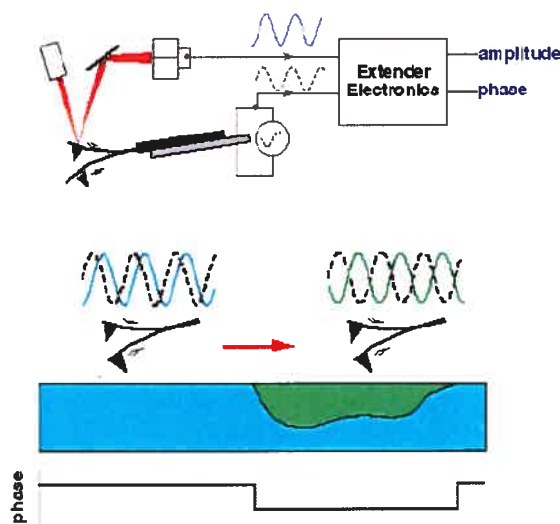


Figure I - 7.4-3 Schéma de la Phase ImagingTM sur un échantillon comportant deux régions aux caractères visco-élastiques différents (Tirée de Babcock et Prater, 1995^[244]).

I - 7.4.1.3 Analyse de la surface

La surface des biomatériaux est une caractéristique importante car elle influence les interactions entre les matériaux, eux-mêmes, et les éléments de l'environnement auxquels ils sont mis en contact. Par exemple, des microsphères, implantées en périvasculaire d'une artère, interagissent avec les cellules adventitielles artérielles ainsi que le liquide interstitiel de l'organisme. Par ailleurs, dans le domaine des sciences biomédicales, en particulier celui des implants, les recherches touchant l'état géométrique des surfaces ont beaucoup progressé au point d'apporter un regard nouveau sur la rugosimétrie. Certes les surfaces restent toujours définies comme rugueuses, lisses ou granuleuses mais la signification de ces termes dépend principalement de l'angle sous laquelle elles sont considérées et évaluées. Comme les paramètres descriptifs de l'état géométrique d'une surface sont nombreux, l'organisation internationale de normalisation (*International Organization for Standardization ou ISO*) a défini des normes internationales qui traitent de la spécification

géométrique des produits comme la norme ISO 4287 [245]. Compte tenu de tous les paramètres existant pour décrire la géométrie d'une surface, n'y aurait-il pas une nouvelle manière plus simple de comprendre un profil de rugosité d'une surface ? La réponse est affirmative. Il s'agit de l'approche par les fractales, dont la figure de proue est le concept de dimension fractale. Connaître la dimension fractale d'une surface permet de simplifier et de visualiser rapidement la rugosité de cette surface.

I - 7.4.1.3.1 Analyse fractale et dimension fractale

Le terme « fractal » a été avancé par Mandelbrot à partir du terme latin « *fractus* » qui signifie interrompu ou brisé. Le concept de fractal permet de généraliser la notion de dimension à des objets complexes, très irréguliers. Dans la géométrie classique, la dimensionnalité d'un objet est défini par un nombre entier tel que zéro (un point), un (une ligne), deux (une surface), trois (un volume) ou quatre. Par contre, les objets fractals sont les objets dont la géométrie peut être décrite par une dimension non entière. En conséquence, les formes géométriques complexes, qui jadis n'étaient représentés que par des images, peuvent désormais être quantifiées, voire cartographiés comme par exemple l'arbre bronchique pulmonaire. Dès lors, l'approche par le concept des fractales peut devenir un outil mathématique d'une grande puissance opérationnelle pour caractériser la complexité d'un profil ou d'une surface.

Le concept des fractales aborde la notion de **dimension fractale, D** :

- Dans le cas d'un objet à une dimension, c'est à dire une ligne : $1 < D < 2$
- Dans le cas d'un objet à deux dimensions, c'est à dire une surface : $2 < D < 3$
- Dans le cas d'un objet à trois dimensions, c'est à dire un volume : $3 < D < 4$

Ainsi, dans le cas d'une ligne, lorsque la courbe est totalement plane, sa dimension fractale est un mais plus la courbe devient compliquée, voire complexe au point d'occuper un secteur surfacique plus étendue, plus sa dimension fractale est élevée et s'approche de la valeur deux : le profil devient alors complexe, autrement dit rugueux. De la même façon,

dans le cas d'une surface, lorsque la surface est totalement plane, c'est à dire lisse, sa dimension fractale est deux mais plus la surface devient compliquée, c'est à dire complexe, au point d'occuper une portion volumique plus grande, plus sa dimension fractale de surface est élevée et s'approche de la valeur trois : la surface devient complexe, autrement dit rugueuse. Le même raisonnement s'applique aussi aux objets volumiques.

La dimension fractale comporte trois caractéristiques principales. Premièrement,

l'équation générale est gouvernée par une **loi de puissance** de type : $y = x^D$

Où : y est une propriété de l'objet telle la longueur, surface ou volume

x est l'échelle

D est la dimension fractale.

La dimension fractale D représente en fait la capacité d'un objet à remplir l'espace qu'il occupe. Elle est comprise entre la dimension topologique D_τ et la dimension

euclidienne D_ε de la manière suivante ^[246] : $D_\tau < D < D_\varepsilon$

La valeur de la dimension fractale est déterminée en mesurant la pente sur un tracé

logarithmique de l'expression suivante : $D = \frac{\log y}{\log x}$

Deuxièmement, il y a **l'invariance d'échelle**, autrement dit, peu importe l'étendue sur laquelle est déterminée la dimension fractale, cette dimension ne change pas car elle correspond à une mesure de l'irrégularité du profil ou de la structure, c'est à dire une mesure de la complexité du profil ou de la structure. Troisièmement, il y a **la similitude interne**. La similarité interne est la propriété, qu'une partie d'un objet a, d'être exactement semblable à l'objet lui-même, à une dilatation près ^[247]. Ce concept de similarité interne

porte aussi le nom de « auto-similarité » (*Self-similarity*). Enfin, il y a la notion d'**affinité interne** qui signifie qu'il existe différents rapports entre les contractions des axes, x et y , lors de la construction de l'objet. Ce concept d'affinité interne porte aussi le nom de « auto-affinité » (*Self-affinity*). Par exemple, les objets fractals naturels, comme le

mouvement brownien, sont auto affines c'est à dire qu'ils possèdent une similitude interne statistique, qui veut dire que les structures observées sont identiques seulement sur une plage d'échelle donnée. Toutefois, il faut distinguer une différence entre la notion de fractale mathématique, où la division va jusqu'à l'infiniment petit et celle de fractale physique, où la notion de similitude interne ne reste valable que sur une échelle finie.

Plusieurs méthodes mathématiques ont été développées pour calculer la dimension fractale d'un objet, lequel peut être par exemple à une, deux ou trois dimensions. Les techniques d'analyse d'images assistées par ordinateur ont beaucoup favorisé la conceptualisation et le développement de nouvelles méthodologies dans la détermination de la dimension fractale. Il existe quelques méthodes pour calculer la dimension fractale, dont les principales sont les suivantes : la méthode du compas, la relation périmètre – surface, la méthode de Minkowski-Bouligand et la méthode de comptage de boîtes. Ces différentes méthodes ont été abordées par plusieurs auteurs comme Peitgen et coll.(1992)^[248], Gouyet (1992)^[249], Addison (1997)^[246] et Tricot (1999)^[246 ; 249 ; 250]. Cependant, il existe une méthode, fort intéressante, présentée par Malinverno (1990)^[251], dite méthode de la Longueur-Rugosité ou de la Longueur-RMS qui n'a jamais été appliquée dans le domaine pharmaceutique, notamment à l'évaluation de la complexité de surface des microparticules et microsphères polymériques.

Malinverno a, en effet, proposé une méthode pour déterminer la dimension fractale de séries spatio-temporelle auto-affines^[251]. Les séries spatio-temporelles de variables naturelles, comme la topographie des surfaces, sont souvent auto-affines dans le sens que des réductions ou des élargissements nécessitent d'être redimensionnés par différents facteurs dans le sens des coordonnées verticales et horizontales pour ressembler à l'original. En d'autres termes, des mesures prises à différentes résolutions auront les mêmes caractéristiques statistiques lorsqu'elles sont redimensionnées par des facteurs qui sont généralement différents pour les coordonnées verticales et horizontales.

Dans son article, l'auteur rappelle que l'auto-affinité, qui montre une anisotropie de la mesure, implique donc que la déviation standard $\sigma(w)$ mesurée sur une plage d'une longueur W soit proportionnelle à $w^H = w^{2-D}$ selon la relation suivante :

$$\sigma(w) = A \cdot w^H = A \cdot w^{2-D}$$

Où : **H** est appelé Exposant de Hurst

D est la dimension fractale

A est une constante

L'exposant de Hurst est relié à la dimension fractale selon la relation : $H = 2 - D$

Dès lors, sa méthode basée sur la relation Longueur-Rugosité (*Roughness-Length method*) consiste à établir un graphique du logarithme de la rugosité de l'objet, mesuré sur une fenêtre de longueur W , en fonction du logarithme de W et estimer les paramètres **H** et **D** à partir de la pente de la droite de régression.

La rugosité est alors en fait une mesure de la valeur du **RMS** (*Root-Mean-Square*). Comme, l'estimation de la tendance implique l'estimation de deux paramètres, pente et intercepte, le **RMS** est calculé en considérant $m_i - 2$ degrés de liberté :

$$RMS(w) = \frac{1}{n_w} \sum_{i=1}^{n_w} \sqrt{\frac{1}{m_i - 2} \sum_{j \in w_i} (z_j - \bar{z})^2}$$

Où : n_w est le nombre total de fenêtre de longueur W ,

m_i est le nombre de points,

z_j sont les points résiduels sur la tendance,

\bar{z} est la moyenne résiduelle dans la $i^{\text{ème}}$ fenêtre w_i

Cette méthode de Longueur-RMS semble très intéressante pour la détermination de la dimension fractale de biomatériaux, dans la mesure où le RMS pourrait être aisément mesuré. Si telle est le cas, alors cette méthode permettrait d'obtenir la dimension fractale de surface des matériaux pharmaceutiques, de n'importe quelle taille, comme par exemple les microparticules. Dans le cas de la dimension fractale de surface, il serait plus approprié d'appeler cette méthode : « méthode surface-RMS ». La connaissance de la dimension fractale de surface permettrait d'avoir une excellente appréciation de la complexité de la surface, donc de l'état de rugosité, des microparticules.

L'analyse fractale a déjà été appliquée dans le secteur pharmaceutique par exemple dans le but de corrélérer la dimension fractale avec le comportement physique des poudres pharmaceutiques. Beaucoup de déterminations de la dimension fractale étaient donc faites au moyen des techniques informatisées d'analyse d'images bidimensionnelles, c'est à dire qu'à partir d'images numérisées, par exemple de poudres, diverses méthodes de calcul pour obtenir la dimension fractale étaient appliquées [252 ; 253]. De plus, il faut dire que la détermination de la dimension fractale étaient souvent obtenus par analyse d'image au moyen des descripteurs de contour de Fourier. Pendant longtemps, l'approche par les descripteurs de Fourier a permis de caractériser facilement la morphologie des particules solides [254]. Caractériser la morphologie des poudres répond dans le domaine pharmaceutique à un véritable besoin puisque la morphologie des particules solides influencent plusieurs paramètres de fabrication comme par exemple l'écoulement des poudres, la rhéologie de suspension, l'adhésion aux surfaces solides, le mélange solide-solide, la compression. Plusieurs auteurs comme Tawashi, Thibert, El-Arini, Ramadan et Akbarieh ont ainsi contribué à l'application de l'analyse de contour de Fourier au secteur pharmaceutique [255 ; 256 ; 257]. Par exemple, Thibert et coll. (1988) ont utilisé l'analyse d'images, en considérant les descripteurs de Fourier, pour évaluer la taille, la forme, l'incrément dimensionnel fractale H (c'est à dire $H = 1 - D$) et la dimension fractale D de

plusieurs particules pharmaceutiques dont le lactose et le sorbitol [258]. Mais ces méthodes comportent en elles-mêmes un biais car elles considèrent l'objet à évaluer, par exemple les particules de principe actif, que dans un espace topologique à deux dimensions. La troisième dimension est occultée par manque de disponibilités instrumentales scientifiques en mesure de la considérer. En d'autres termes, dans ce genre d'approche, le biais porte sur les images des poudres car elles ne montrent pas les trois dimensions du solide correctement, en particulier la dimension verticale (l'axe des z) de relief manque. Certes, il y a eu des développements de plusieurs techniques qui permettent d'évaluer la dimension fractale de surface sur des matériaux pharmaceutiques comme les poudres. À titre d'exemple de techniques, il y a notamment l'adsorption de gaz et la porosimétrie au mercure. Certes la profilométrie optique qui utilise un faisceau laser à diode pour effectuer point à point le balayage de la surface de l'objet constitue déjà une amélioration. Dans ce cas, chaque point est repéré dans l'espace puis est représenté par ses coordonnées (x, y) et la hauteur relative $z(x, y)$ par rapport à une référence externe. Il s'agit d'une méthode d'analyse qui se base sur le principe de la triangulation. Plusieurs chercheurs ont appliqué cette technique dans le domaine biomédicale [259] et pharmaceutique [260]. Avec le développement de la nanotechnologie, la microscopie à force atomique a émergé. L'AFM est un outil remarquable car il permet maintenant de considérer les trois dimensions, c'est à dire selon l'axe des x , l'axe des y et l'axe des z , de n'importe quel genre d'échantillon. En conséquence, comme les données recueillies à partir d'un échantillon sont numérisées par le microscope à champ proche, elles rendent alors possible tout traitement ultérieur par une méthode appropriée pour évaluer la dimension fractale. Ainsi, avec l'AFM, commence donc à apparaître la possibilité d'utiliser cet outil pour mesurer la rugosité de surface, comme l'indique l'article de Simpson et coll. (1999) qui compare le mode contact avec le mode *tapping* dans l'évaluation de la rugosité de surface [261]. Mais il semble n'exister qu'un article récent mentionnant l'application de l'analyse fractale à des particules pharmaceutiques par la microscopie à force atomique. Il s'agit de l'article de Li et Park (1998) dans lequel les auteurs ont utilisé la méthode de variation pour obtenir la dimension

fractale [262]. Il s'agit en fait d'une méthode qui a été développée par Claude Tricot. Cette approche, qui est applicable pour des graphes de fonctions continues ayant une tendance verticale, est dérivée de la méthode de Minkowski-Bouligand, en extrapolant la forme des boules jusqu'à l'obtention d'un carré plat. Cette méthode de variation a été largement présentée dans le livre de Tricot [250]. En outre, cette méthode a aussi été appliquée par Thibert et coll. (1993) pour mesurer la dimension fractale des calculs rénaux [260]. Or, compte tenu des fonctionnalités de l'AFM, il serait opportun de déterminer la dimension fractale d'une surface d'un échantillon en utilisant simplement un paramètre important du profil de la surface, comme le RMS et dans ce cas appliquer la méthode Surface-RMS pour calculer la dimension fractale de la surface étudiée.

I - 7.4.2 Caractérisation structurale interne par analyse thermique

L'analyse structurale interne des microparticules est importante car elle vise à déterminer l'état physique du principe actif microencapsulé. Connaître l'état physique du principe actif est essentiel dans la mesure où il influence certaines caractéristiques importantes comme la vitesse de libération et la stabilité de la molécule autant que de la forme pharmaceutique, elle-même. Dans le cadre de cette recherche, l'analyse structurale interne est réalisée de manière thermique par l'analyse thermogravimétrique et l'analyse enthalpique différentielle des échantillons de microsphères. En fait, il existe plusieurs orientations de l'analyse thermique, qui dans son sens large recouvre l'ensemble des techniques qui mesure les variations des propriétés physiques et chimiques d'une substance en fonction de la température.

I - 7.4.2.1 Analyse thermogravimétrique à haute résolution

La thermogravimétrie (TGA) enregistre la perte de poids d'un échantillon en fonction de l'augmentation de la température. À partir des résultats il est possible d'obtenir deux tracés typiques de courbes (thermogrammes). D'une part, il y est possible d'avoir un thermogramme de la courbe des pertes de poids en fonction de la température et d'autre part, un thermogramme de la courbe dérivée en fonction du temps de celle des pertes de poids en fonction de la température. La TGA est particulièrement utilisée pour observer la décomposition thermique de composés chimiques. Lorsque des décompositions thermiques individualisées apparaissent à des températures bien séparées, il est alors possible de déduire une information quantitative au sujet de la composition de l'échantillon, notamment à partir du changement de son poids (en pourcentage) pour chaque transition. Cependant il peut arriver que des décompositions thermiques à la TGA soient masquées par la vitesse de chauffe à cause de la nature de la réaction, dépendante du temps, qui a lieu dans l'échantillon. La thermogravimétrie à haute résolution remédie à ce genre de recouvrement. Dans ce cas, la vitesse de chauffe est modifiée continuellement et de façon dynamique en réponse aux changements du taux de décomposition de l'échantillon ce qui accroît et maximise la résolution de l'analyse du changement du poids de l'échantillon.

I - 7.4.2.2 Analyse enthalpique différentielle

Les bases théoriques de l'analyse enthalpique différentielle ou DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) ont déjà été établies, confirmées et adoptées par les instances gouvernementales pour la régulation des médicaments. Les applications de la DSC dans le secteur pharmaceutique sont nombreuses et variées. Par exemple, il y a des déterminations de grandeurs physico-chimiques, relatives à la substance comme par exemple, la chaleur spécifique (massique) et les transformations physiques de la substance dont les transformations du premier ordre (comme par exemple, la fusion, la vaporisation, la sublimation, et les transformations polymorphiques du produit) et les transformation du

second ordre (comme par exemple, la transition vitreuse d'un polymère semi-cristallin). Il peut y avoir aussi l'analyse et le contrôle des matières premières, la mise au point de formes galéniques, le contrôle de la stabilité chimique et les études des matériaux d'emballage et d'enrobage des formes pharmaceutiques. Les analyseurs de DSC enregistrent la variation d'enthalpie, ΔH , (chaleur absorbée ou émise à tout instant par un échantillon) en fonction de la température, T , (en °C). Cette variation d'enthalpie est exprimée en vitesse de chauffe, $\frac{dH}{dt}$, (en mJ/s, ou en mcal/s ou possiblement encore en équivalent de la puissance électrique fournie, c'est à dire en mW). Cette mesure de DSC est aussi directement proportionnelle à la chaleur spécifique ou capacité calorifique C_p (en calorie par gramme et par degré Celsius (cal / g . °C) ou en Joule par gramme et par degré Celsius (J / g . °C)) de la substance (de masse m , en g) dans l'intervalle de température considérée :

$$\Delta H = m \cdot C_p \cdot \Delta T \quad \text{autrement dit :} \quad \frac{dH}{dt} = m \cdot C_p \cdot \frac{dT}{dt}$$

Dans le cas des polymères semi-cristallins, la variation de la capacité calorifique en fonction de la température apporte une information précieuse dans l'étude de leur transition vitreuse. Ainsi l'analyse par DSC enregistre aisément les transformations du premier ordre, qui se manifestent par des pics endothermiques (par exemple, les pics de fusion) ou exothermiques (par exemple, les pics de cristallisation). De plus, elle enregistre aussi les transformations d'ordre supérieur telles que les transitions vitreuses qui sont du second ordre. Pour ces dernières, il n'y a pas d'enregistrement de pic mais un déplacement de la ligne de base, qui est lié aux seules variations de la capacité calorifique, C_p . Suivant leur constitution chimique et leur structure, les polymères peuvent se présenter essentiellement sous trois états, l'état cristallin, l'état amorphe et l'état semi-cristallin. L'état cristallin ou vitreux, qui correspond à l'arrangement le mieux ordonné des chaînes macromoléculaires et qui est se manifeste sous la forme de monocristaux de petites dimensions. L'état amorphe ou caoutchouteux, qui correspond à un enchevêtrement désordonné des chaînes macromoléculaires. L'état semi-cristallin, qui comporte les deux états, cristallin et

amorphe, selon des proportions variables et qui présente au niveau macroscopique, les propriétés de l'état amorphe et celles de l'état cristallin. Il est possible de passer d'un état à un autre en élevant ou en abaissant la température du polymère. Ce changement d'état du polymère affecte ses propriétés physiques et mécaniques. Par ailleurs, pour les polymères totalement amorphes, deux transitions sont à relever ^[263]. D'une part, il y a la vitrification, qui est le passage de l'état vitreux à l'état caoutchouteux et qui est caractérisée par la température de transition vitreuse ou T_g (*glass transition* ou T_g) et d'autre part, il y a la fluidification, qui est le passage de l'état caoutchouteux à l'état visqueux, rendue possible à plus haute température et qui est caractérisée par une température de fusion (T_{fl}). Dans le cas de polymères semi-cristallins, à ces deux transitions, il se rajoute le phénomène de fusion de la phase cristalline, caractérisé par une température de fusion (T_f), supérieure à la température de fluidification (correspondant dans ce cas à T_{fl}) ^[263]. Les transitions de phases dans le cas des polymères semi-cristallins ne se produisent pas à une température bien définie dues à la polymétrie des chaînes macromoléculaires, c'est à dire à la dispersion des chaînes ^[264]. La transition vitreuse revête un caractère important dans l'application des polymères semi-cristallin, en particulier dans le développement et la stabilité des formes pharmaceutiques. À l'état vitreux, en dessous de la température de transition vitreuse, l'agitation thermique est trop faible pour surmonter les forces d'interaction entre les chaînes macromoléculaires, qui restent alors figées dans des conformations rigides ce qui explique le peu, voire l'absence, de souplesse du matériau polymérique. Seuls les mouvements de vibrations et de rotations partielles au niveau des liens de valence demeurent possibles. Au fur et à mesure que la température augmente, il arrive une plage de température où l'agitation thermique est suffisamment forte pour vaincre les forces d'interactions entre les chaînes : C'est la transition vitreuse. Au-delà de cette plage de température, les chaînes macromoléculaires peuvent faire des translations plus amples, ce qui confère au polymère la souplesse ^[263]. Il existe plusieurs théories pour expliquer la transition vitreuse ^[264]. Ainsi, il est connu que plusieurs facteurs peuvent influencer la

transition vitreuse. Ce sont notamment la masse molaire, la structure moléculaire du polymère, la présence de plastifiant et le niveau de cristallinité du polymère semi-cristallin. Durant le développement pharmaceutique, il convient de bien déterminer la température de transition vitreuse à partir de laquelle le matériau polymérique devient amorphe. Un défaut de caractérisation de la transition vitreuse induit une incertitude sur la connaissance de l'état amorphe du matériau polymérique. L'état amorphe possède une énergie interne plus grande ainsi qu'un volume spécifique supérieur à l'état cristallin ce qui peut conduire à favoriser la dissolution et la biodisponibilité du principe actif, mais peut aussi affecter grandement la stabilité et la conservation de la forme pharmaceutique par le fait qu'il peut se produire un retour à l'état cristallin spontanément.

I - 7.4.3 Analyse chimique de la surface par spectroscopie Raman

Plusieurs instruments permettent d'étudier les molécules chimiques à la surface des biomatériaux. Parmi eux, les plus récents spectroscopes Raman commencent intéresser la recherche pharmaceutique. Découvert en 1928 par Sir C.V. Raman, les principes de la spectroscopie Raman sont depuis bien établis car ils font aussi bien appel à la mécanique quantique qu'à la mécanique classique ^[265 ; 266]. Il s'agit d'une méthode spectroscopique d'analyse chimique non-destructive de la structure des matériaux. L'effet Raman est en fait un phénomène de changement de longueur d'onde qui accompagne la diffusion de la lumière dans les matériaux. Le principe de base de l'effet Raman peut être expliqué brièvement par le fait qu'un faisceau de lumière monochromatique incident, de fréquence ν_0 , envoyé sur un matériau, peut être en partie transmis, absorbé, réfléchi, ou diffusé ^[267 ; 268]. Les informations obtenues par la spectrométrie Raman sont très étendues. Les principales sont les suivantes : l'identification de substances chimiques, la caractérisation des matériaux, la détermination de la structure moléculaire et les études des systèmes amorphes et cristallins.

II Objectifs

Les objectifs sont répartis en objectifs généraux et en objectifs spécifiques.

II - 1 Objectifs Généraux

Les objectifs généraux sont d'apporter une contribution à l'étude et la caractérisation des vecteurs pharmaceutiques microparticulaires dans une stratégie d'administration périvasculaire pour inhiber la prolifération néo-intimale dans un modèle d'artère de rats Sprague-Dawley. La contribution à cette étude comporte trois volets principaux :

- Un volet de formulation et de production des vecteurs microparticulaires par nébulisation (*spray-drying*).
- Un volet de caractérisation des vecteurs microparticulaires par analyse morphologique et granulométrique, analyse de la complexité de surface, analyse thermique et analyse chimique de surface, au moyen d'instruments les plus récents.
- Un volet d'application *in vivo* des vecteurs microparticulaires, par la voie d'administration périvasculaire, en utilisant deux modèles de principe actif, le L-158,809 et le Captopril, chez des rats Spragues Dawley ayant subi une procédure d'angioplastie au ballonnet.

II - 2 Objectifs spécifiques

Les trois volets, production, caractérisation et application *in vivo*, des vecteurs microparticulaires comportent des objectifs spécifiques propres à chaque catégorie d'expériences.

II - 2.1 Objectifs spécifiques à la production des microsphères

Dans le volet formulation et production, le souci a été de rechercher la possibilité de produire efficacement et rapidement des microsphères parmi l'ensemble des méthodes existantes pour l'obtention de vecteurs microparticulaires. La technique par nébulisation a été choisie préférentiellement. Les objectifs recherchés à ce niveau sont de développer une formulation et de mettre au point une méthode de nébulisation qui puisse permettre l'obtention d'un rendement, jugé acceptable, de microencapsulation du principe actif.

II - 2.2 Objectifs spécifiques à la caractérisation des microsphères

Dans le volet de caractérisation des vecteurs microparticulaires, le souci a été de choisir le plus adéquatement possible les méthodes et les instruments nécessaires pour effectuer le genre d'analyse recherchée.

La recherche de la taille des microsphères ou analyse granulométrique a été effectuée selon la méthode par corrélation de photons d'après l'hypothèse que les microsphères nébulisées, obtenues au moyen du BÜCHI 190, pourraient avoir une taille entre un à trois microns.

L'analyse morphologique a été effectuée par microscopie électronique à balayage (SEM) dans le but de visualiser les microsphères obtenues.

À la suite des résultats obtenus après ces deux expériences, une question a été posée: « Est-il possible de visualiser les microsphères avec une résolution qui puisse être encore meilleure et dont les données expérimentales pourraient être exploitables ? ». La microscopie à force atomique (AFM) semblait répondre aux attentes recherchées. L'outil technologique étant trouvé, l'objectif était alors de mettre au point une méthode d'imagerie par AFM pour révéler la morphologie et la taille des microsphères avec une précision qui puisse être meilleure que celles obtenues par la SEM et par la spectroscopie par corrélation de photons, compte tenu de la nature des échantillons évalués. Il était apparu que le microscope à force atomique semblait être également un outil de choix pour évaluer aussi la

complexité de surface des microsphères. Dès lors, une première démarche a été de choisir la meilleure approche mathématique apte à permettre d'appréhender la complexité de surface d'un objet. L'analyse fractale par l'obtention de la dimension fractale de surface était l'outil mathématique par excellence pour ce genre de recherche. La seconde démarche a été alors d'utiliser l'AFM pour l'évaluation de la complexité de surface des microsphères par détermination de leur dimension fractale de surface au moyen d'une analyse fractale appropriée (méthode de Malinverno avec le RMS ^[251]) n'ayant jamais été appliquée au secteur pharmaceutique.

L'analyse thermique des microsphères a été effectuée dans le but de comprendre le comportement des microparticules soumises à l'effet croissant de la température. À cet effet, deux techniques ont été employées, la thermogravimétrie à haute résolution (TGA) et l'analyse thermique différentielle (DSC). La thermogravimétrie est une méthode analytique connue mais la technologie récente qui permet la haute résolution a été très peu mise à profit au domaine pharmaceutique, notamment à l'étude des microsphères. C'est pourquoi, le but recherché dans les expériences de TGA à haute résolution a visé essentiellement à évaluer les formulations des microsphères nébulisées, en fonction du nombre de leurs constituants, et par conséquent à montrer qu'il était possible d'appliquer efficacement cet outil dans les sciences pharmaceutiques. L'analyse par DSC a été effectuée dans le but de déterminer si le principe actif microencapsulé était à l'état cristallin ou sous forme d'une dispersion solide moléculaire dans les microsphères.

L'analyse chimique de surface a été entreprise en utilisant la spectrométrie Raman. La spectrométrie Raman est utilisée habituellement pour des analyses chimiques mais l'est très peu dans le domaine pharmaceutique. Pourtant, les récents spectromètres Raman possèdent une très haute résolution, au point qu'ils ont la capacité de discriminer différentes formes polymorphes. C'est pourquoi, un axe de recherche a été d'appliquer la spectrométrie Raman, notamment dans l'infrarouge proche, au domaine pharmaceutique, en particulier à l'évaluation de la surface chimique des microsphères.

II - 2.3 Objectifs spécifiques à l'application *in vivo* des microsphères

Puisque la recherche présente met l'emphasis sur l'aspect de technologie pharmaceutique et non pas de pharmacologie, il est important de retenir que l'idée première est avant tout de valider l'outil de technologie pharmaceutique (les microsphères nébulisées) puis la formulation choisie. Ainsi, il n'a jamais été dans l'objectif de développer une formulation commercialement acceptable, ni même de mettre au point un traitement pharmacologique plus efficace dans le traitement de l'inhibition de l'hyperplasie néo-intimale. L'objectif principal recherché était donc avant tout d'évaluer le potentiel de libération *in vivo* d'un modèle médicamenteux hors de la matrice polymérique des microsphères nébulisées. La libération *in vivo* du médicament microencapsulé hors des microsphères pouvait être appréhendé par les effets pharmacologiques des médicaments eux-mêmes. Ainsi, des effets pharmacologiques des médicaments microencapsulés, significatifs pour un seuil de signification choisi (notamment le seuil 0,05) par rapport à ceux d'un groupe contrôle, signifieraient alors qu'une libération des principes actifs hors des microsphères s'est bien produit. Ainsi, l'application *in vivo* des microsphères a été effectuée selon la voie d'administration périvasculaire, sur des modèles d'artères de rats Sprague Dawley, ayant reçu une angioplastie carotidienne. Les deux modèles utilisés de principe actif étaient alors le L-158,809 et le Captopril. Dans l'objectif d'évaluer le plein potentiel de libération du principe actif hors des microsphères nébulisées, il devenait important de vérifier si un dépôt périvasculaire de L-158,809 microencapsulé pouvait permettre d'inhiber la prolifération néo-intimale dans le modèle adopté. De plus, dans le but de mieux augmenter les effets pharmacologiques du L-158,809, quant au paramètre de la prolifération néo-intimale, une étude de bimédication, à partir des microsphères comportant du L-158,809 et du Captopril, a été entreprise selon le mode de dépôt périvasculaire. En effet, puisque le L-158,809 est un antagoniste non peptidique mais sélectif des récepteurs AT₁ de l'angiotensine II, l'idée d'ajouter un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA), comme le Captopril, devrait éventuellement potentialiser les effets pharmacologiques du L-158,809.

III Matériels et méthodes

III - 1 Matériels

Le matériel utilisé au cours des recherches peut être séparé en trois parties. Il y a les produits et les appareils utilisés et enfin, les animaux pour les études *in vivo*.

III - 1.1 Produits et animaux

Les matériaux polymériques utilisés étaient les suivants :

- Les polymères d'acide D,L-poly lactique, fournis par le Professeur J.N. McMullen (Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada). Leurs poids moléculaires en poids (PM) et leurs indices de polydispersité (encore appelés indices de polymolécularité) étaient les suivants :
 - 43 556 PM : indice de polydispersité : 2.94 (lot G3001)
 - 49898 PM : indice de polydispersité : 2.49 (lot G1003)
 - 66 815 PM : indice de polydispersité : 2.62 (lot G1002)
 - 73 405 PM : indice de polydispersité : 1.89 (lot R2002)
 - 95 248 PM : indice de polydispersité : 2.35 (lot G1007)
- Le polymère d'acide poly (lactique-co-glycolique) ou PLGA (PLGA pour « poly (lactide-co-glycolide) »), de poids moléculaire de 48 000 PM et appelé Resomer RG504 (Boehringer Ingelheim, Wallingford, CT, États-Unis).
- Le chitosan (Sigma-Aldrich, Canada)

Les principes actifs utilisés étaient les suivants :

- La Dexaméthasone (Hoechst Marion Roussel, Paris, France)
- Le L-158,809 (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, États-Unis).
- Le Captopril (Bristol Myers Squibb, Canada-États-Unis).

Un excipient, entrant dans la composition des microsphères, était :

- Le polyéthylène glycol-1540 distéarate (PEG-1540 distéarate), encore appelé Poloxyl-32 distéarate ou Polyoxyéthylène-32 distéarate (Calgene Chemical, Skokie, IL, États-Unis). Selon le Handbook of Pharmaceutical Excipients (1994)^[269], il s'agit d'un agent émulsifiant, solubilisant et mouillant, qui est aussi soluble dans l'eau et dont le point de fusion est " $\approx 45^{\circ}\text{C}$ " (environ 45°C).

Les solvants utilisés étaient les suivants :

- Le dichlorométhane, de grade HPLC (HPLC pour « High Performance Liquid Chromatography ») ou de grade ACS (*American Chemical Society Specification*).
- Le tétrahydrofurane, de grade HPLC ou de grade certifié.
- Le chloroforme, de grade HPLC.

La solution de kétamine-Xylazine (87 mg/kg et 13 mg/kg respectivement).

L'eau utilisée était toujours purifiée par osmose inverse avec un appareillage Millipore.

III - 1.2 Appareils

Les appareils utilisés étaient les suivants :

- Un nébuliseur (spray-dryer), modèle Büchi-190 (Büchi, Flawil, Suisse) avec une buse d'un diamètre d'un demi-millimètre.
- Un microscope électronique (Scanning Electronic Microscopy) (Bruker, Canada-États-Unis) utilisé chez Merck Frosst Canada.
- Un spectroscope analyseur de taille de particules par corrélation de photons, le Coulter N4 Plus (Coulter Electronics Inc., Miami, Floride, États Unis).
- Un spectrophotomètre d'absorption de l'ultra-violet et du visible, modèle HP 8452A Diode Array Spectrophotometer (Hewlett-Packard, Canada)

- Des cathéters à ballonnet de Fogarty, pour embolectomie artérielle, de taille 2F (2-French size) et de modèle Baxter 120602F, commercialisés par la compagnie Edwards Lifesciences Corporation (Irvine, CA, États-Unis).
- Un système numériseur informatisé d'analyse d'image et de morphométrie, modèle Bioquant (R&M Biometrics Corporation, Nashville, TN, États-Unis)
- Un appareil d'analyse enthalpique différentielle, modèle DSC Differential Scanning Calorimeter 2910 (TA Instruments Inc., New Castle, DE, États-Unis)
- Un analyseur de thermogravimétrie à haute résolution, modèle Hi-Res TGA 2850 (TA Instruments Inc., New Castle, DE, États-Unis).
- Un microscope à force atomique, modèle Dimension 3100 (Digital Instrument Inc., Santa Barbara, CA, États-Unis) et son logiciel d'analyse pour le traitement des données AFM, version v4.42r4 (pour Windows NT , Windows 2000 Professionnel).
- Les pointes utilisées lors des balayages en AFM étaient des pointes standards TESP.
- Un spectromètre Raman série RM 3000 (Renishaw, Gloucestershire, Angleterre)

III - 1.3 Animaux

Les rats utilisés étaient des Sprague-Dawley mâles, pesant entre 325 gr et 350 gr.

III - 2 Méthodes

Les méthodes utilisées étaient divisées en deux parties :

- La partie *in vitro* de production et de caractérisations des microsphères.
- La partie *in vivo*, qui concernent des études sur l'utilisation des microsphères dans des modèles d'artères de rats, dans le but de libérer deux modèles de principe actif pour inhiber la prolifération néo-intimale.

III - 2.1 Études in vitro

Les études *in vitro* concernaient la méthode de fabrication des microsphères par nébulisation et les méthodes de caractérisation de ces derniers.

III - 2.1.1 Fabrication des microsphères

La méthode de préparation des microsphères était la nébulisation (*spray-drying*) avec le nébuliseur BÜCHI 190, muni d'une buse de 0,5 millimètre de diamètre. L'approche pour produire des microsphères est simple et est toujours la même pour l'ensemble des microsphères produites dans le cadre de cette recherche. Le principe était d'obtenir une solubilisation du polymère, de l'excipient et du (ou des) principe(s) actif(s) dans une même solution de solvant organique. L'étape de solubilisation était toujours appuyée par une agitation continue du mélange de manière à favoriser la vitesse de solubilisation du polymère et des autres substances. Pendant ce temps, les paramètres techniques tels que les températures d'entrée et de sortie, la puissance de l'aspiration, le débit d'air ainsi que la vitesse de la pompe étaient ajustés en utilisant une solution contenant uniquement le même solvant organique. Une fois le réglage de l'appareil et la solubilisation des substances accomplis, la solution du mélange contenant tous les produits de la formulation était nébulisée. Toutes les microsphères étaient alors récupérées à partir du cyclone et du récipient des produits finis.

Le polymère PLA, le L-158,809, le Captopril ainsi que le PEG-1540 distéarate sont solubles dans le dichlorométhane (solvant organique).

De plus, les notations PLA 50/50 et PLA 60/40 signifient que la matrice polymérique de PLA, qui constituait les microsphères de PLA, était définie de la manière suivante :

- ratio 50/50 : 50 % de PLA 73 405 PM et 50 % de PLA 43 556 PM,
- ratio 60/40 : 60 % de PLA 73 405 PM et 40 % de PLA 43 556 PM,

Les taux de microencapsulation d'un principe actif au sein des microsphères signifient le poids du principe actif sur le poids total de la microsphère et sont exprimés en pourcentage (poids / poids). Par exemple, des microsphères de PLA avec 20 % de L-158,809 signifient qu'il y a une teneur de 20 % (en poids) de L-158,809 dans le poids total de la microsphère.

Le ratio polymère sur PEG-1540 distéarate était huit (ratio 8/1).

Les paramètres de microencapsulation étaient les suivants :

- La température d'entrée (*inlet temperature*) : 58°C à 60°C
- La température de sortie (*oulet temperature*) : 40°C à 42°C
- Le contrôle d'aspiration (*aspirator control*) : Position 15
- Le contrôle de la pompe (*pump control*) : Position 10 (8 ml/min)
- La pression d'air à l'entrée (*air flow*) : 32 à 35 kg / cm²

Par ailleurs, le PLGA a aussi été utilisé pour produire des microsphères polymériques.

Le PLGA et la Dexaméthasone sont solubles dans le chloroforme

III - 2.1.2 Caractérisation des microsphères

Les méthodes de caractérisation sélectionnées devaient être les plus appropriées.

III - 2.1.2.1 Évaluation de l'efficacité d'encapsulation

Le rendement de microencapsulation du médicament était obtenu en suivant la même procédure. Une quantité de 10 mg de microsphères, correspondante à une quantité théorique donnée en médicament devant y être présente, était dissoute dans 50 ml de tétrahydrofurane (THF), puis analysée au moyen du spectrophotomètre d'absorption de l'ultra-violet (UV) et du visible, à la longueur d'onde d'absorption maximale du médicament à doser. La valeur de l'absorbance obtenue était alors comparée aux données

d'une droite standard (absorbance versus concentration) établie pour ce même médicament, en solution dans le THF, dans le but de déterminer la quantité expérimentale de médicament contenue dans les microsphères. La droite standard était la courbe de l'absorbance mesurée en fonction de la concentration connue du médicament dans le THF. Le coefficient de corrélation de la droite standard devait toujours être proche de 0.99. Enfin le taux de microencapsulation du médicament était calculé en divisant la quantité expérimentale microencapsulée de médicament par la quantité théorique de médicament devant être présente dans les microsphères, puis en multipliant par cent.

Les médicaments dosés étaient les suivants :

- Le L-158,809 (longueur d'onde d'absorption maximale dans le THF : 284 nm)
- Le Captopril (longueur d'onde d'absorption maximale dans le THF : 244 nm)
- La Dexaméthasone (longueur d'onde d'absorption maximale dans le THF : 238 nm)

III - 2.1.2.2 Morphologie des microsphères

La morphologie des microsphères était évaluée à l'aide de la microscopie électronique à balayage (SEM) et de la microscopie à force atomique (AFM).

III - 2.1.2.2.1 Analyse par la microscopie électronique

Par la microscopie électronique à balayage (SEM), il était aussi possible d'apprécier qualitativement la morphologie des microsphères obtenues, avec des grossissements plus forts que ceux la microscopie photonique. La méthodologie était essentiellement la suivante : Les microsphères étaient fixées au porte-échantillon du microscope à l'aide d'un adhésive double face. Puis, toutes les microsphères étaient soumises à l'enrobage d'une fine couche d'or pendant trois minutes avant évaluation.

III - 2.1.2.2.2 Analyse par la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique a permis une meilleure évaluation de la morphologie des microsphères, sous un nouvel aspect plus intéressant car les données obtenues rendaient comptes des trois dimensions spatiales et pouvaient être numérisées. En conséquence, l'état morphologique des microsphères était alors évalué en considérant des analyses de section et des analyses de rugosité de surfaces des microsphères.

Pour la caractérisation par AFM, les microsphères étaient fixées à un support métallique, via une mince couche de paraffine. Le type de balayage opéré en AFM était le mode contact-intermittent, encore qualifié *Tapping*. Les balayages des surfaces des microsphères étaient effectués à l'aide d'une pointe (*tip*), de modèle TESP, attachée à l'extrémité d'un porte-pointe vibreur (*cantilever*). L'amplitude du *cantilever* était toujours maintenue constante grâce à la propriété que possédait le balayeur (*scanner*) de modifier sa position verticale. Cette propriété permettait de numériser la topographie des surfaces des microsphères et toutes les données numériques étaient alors enregistrées. De plus, lors des balayages, comme les vibrations du *cantilever* induisaient des déphasages dans les signaux, en corrélation avec les variations dans les décalages des vibrations, le respect de la liberté du mouvement vibratoire du *cantilever* étant toujours assuré, des images de phases pouvaient alors être numérisées car tous déphasages étaient enregistrés sous la forme de régions sombres et de régions claires, qui ne sont autres que des fonctions de la phase. Également, comme il était possible d'enregistrer simultanément l'image topographique et l'image des signaux de phase des surfaces des microsphères, il était par conséquent possible de comparer les surfaces dures et les surfaces molles. Par ailleurs, en contrôlant le contraste sur les images de topographie, les surfaces des microsphères pouvaient être visualisées avec une grande résolution. Les images étaient enregistrées avec une vitesse de balayage (*scan rate*) lente, en dessous de 1 Hz, correspondant au nombre de passage, aller et retour, des lignes de balayage par seconde. Afin d'avoir toujours une bonne résolution visuelle, chaque image avait une résolution de 512 par 512 pixels.

III - 2.1.2.2.2.1 Analyse de la section des microsphères

Les analyses AFM de section des microsphères étaient qualitatives dans le but de vérifier leur morphologie sphérique.

III - 2.1.2.2.2.2 Analyse de la rugosité par l'analyse fractale

L'analyse de la rugosité de surface des microsphères était rendue possible par l'application de l'analyse fractale. La méthode, adaptée d'après Malinverno (1990)^[251], est basée sur le RMS du profil de la surface d'un objet. Elle n'a jamais été appliquée dans le domaine pharmaceutique et en particulier pour les microsphères. La possibilité de recourir à un outil exceptionnel en précision et en résolution qu'est le microscope à force atomique devrait permettre l'application de la méthode à la détermination de la dimension fractale de surface des microsphères. Ainsi, après la prise numérique d'une image topographique des microsphères, plusieurs tailles d'aires à différents endroits de la surface de la microsphère étaient sélectionnées et au moyen du logiciel d'AFM intégré de DI Instrument Inc., il était possible d'obtenir le RMS correspondant à chaque aire sélectionnée. Puis, à partir de la droite de régression du graphique du logarithme du RMS en fonction du logarithme de l'aire correspondante, il était possible d'y déterminer une pente à partir de laquelle la dimension fractale de surface pouvait être alors calculée de la manière suivante :

$$\text{Dimension fractale de surface} = 3 - \text{pente}$$

La dimension fractale de surface se situe entre la valeur deux et la valeur trois. Plus elle est proche de la valeur deux, plus le profil de la surface est plat, autrement dit lisse. Par contre, plus elle est proche de la valeur trois, plus le profil de la surface est irrégulier, autrement dit rugueux.

III - 2.1.2.3 Analyse de la taille des microsphères

La distribution de la taille des microsphères était déterminée par la spectroscopie par corrélation de photons, à l'aide du N4 Plus Coulter. Les microsphères étaient diluées dans du tampon phosphate pH 7.4 de manière à obtenir un taux de particules entre 5×10^4 et 1×10^6 particules par secondes, selon la recommandation du manufacturier. Le diamètre moyen des particules était obtenu selon l'interprétation par le mode de distribution SDP, en utilisant les paramètres suivant :

- Indice de réfraction du fluide : 1,33 (pour l'eau),
- Température : 20 °C,
- Viscosité : 0,93 centipoise,
- Angles de mesures : 11,1° ; 15,7° ; 23° ; 30,1° ; 62,6° et 90°
- Temps d'échantillonnage : 10,5 microsecondes,
- Temps de mesure : 90 secondes,

III - 2.1.2.4 Analyse thermique des microsphères

L'analyse thermique des microsphères était effectuée en utilisant l'analyse enthalpique différentielle et l'analyse thermogravimétrique à haute résolution.

III - 2.1.2.4.1 Analyse enthalpique différentielle des microsphères

L'analyse enthalpique différentielle des microsphères était effectuée avec l'analyseur DSC Differential Scanning Calorimeter 2910. Le gaz de purge était l'hélium à ultra haute pureté. La méthode utilisée pour évaluer le comportement thermique des microsphères était effectuée sur une étendue de température pouvant s'échelonner de 25 °C à 400 °C, selon une vitesse de chauffe de 5 °C par minute, 10 °C par minute ou 20 °C par

minute. Chaque tracé de thermogramme correspond au débit calorifique, en milliwatt (mW) qui est proportionnel à la vitesse de chauffe (mJ/s ou mcal/s) en fonction de la température (°C). Le poids de chaque échantillon étudié lors de l'analyse thermogravimétrique ne dépassait pas 10 mg. Dans le cas des expériences de trempe, les échantillons de microsphères subissaient une chauffe constante jusqu'à une température au delà de leur température de transition vitreuse puis un refroidissement rapide était effectué au moyen de l'azote liquide pour ramener la température des microsphères en dessous de leur température de transition vitreuse. La température de transition vitreuse était déterminée en appliquant les recommandations du logiciel Universal Analysis de TA Instruments Inc., qui accompagne l'analyseur DSC pour le traitement des données. Le logiciel permet d'obtenir les paramètres suivants : la température de transition vitreuse (T_g), la variation de la capacité calorifique à la T_g (J/g/°C), les pics endothermiques (°C) ainsi que leur chaleur de fusion (J/g) et les pics exothermiques (°C) ainsi que leur chaleur de fusion (J/g).

Enfin, la convention adoptée dans la présente étude, pour l'enregistrement et l'évaluation des thermogrammes, était que le tracé de la courbe (l'enregistrement de la chaleur différentielle en fonction de la température) évolue dans le sens exothermique vers le haut et dans le sens endothermique vers le bas.

III - 2.1.2.4.2 Analyse thermogravimétrique à haute résolution des microsphères

L'analyse thermogravimétrique à haute résolution des microsphères était effectuée à l'aide de l'analyseur thermogravimétrique à haute résolution, modèle Hi-Res TGA 2850. Le gaz de purge était l'azote sec ultrapure. Le comportement de la dégradation thermique était évalué sur des microsphères de PLA, contenant du PEG-1540 distéarate, avec ou sans médicament microencapsulé, sur une étendue de température allant de 25 °C à 600 °C, selon une vitesse de chauffe de 20 °C par minute, sous une atmosphère contrôlée d'azote.

Le poids de chaque échantillon étudié lors de l'analyse thermogravimétrique ne dépassait pas 10 mg.

Les différentes catégories de microsphères étudiées pouvaient présenter les caractéristiques suivantes :

- Elles étaient composées seulement de PLA (95 248 PM)
- Elles étaient composées seulement de PLA et de PEG-1540 distéarate,
- Elles étaient composées de PLA, de PEG-1540 distéarate et d'un médicament :
 - o Le médicament était soit le L-158,809 ou soit le Captopril.
 - o Le médicament présentait un taux de microencapsulation théorique, qui était soit 10 %, soit 20 %, soit 30 % ou soit 40 %.

Chaque thermogramme était évalué directement par le mode analyse thermogravimétrique qui exprime le pourcentage de la perte de masse des échantillons en fonction de la température (en degré Celsius) et par le mode analyse thermogravimétrique dérivée qui exprime les résultats de l'analyse thermogravimétrique en y considérant la courbe de la dérivée première comme une fonction de la température, autrement dit, ce mode exprime la dérivée de la perte de masse (en pourcentage) de l'échantillon en fonction de la température (en degré Celsius).

III - 2.1.2.5 Analyse chimique de la surface des microsphères par la spectroscopie Raman

L'analyse chimique de la surface des microsphères était effectué par la spectroscopie Raman au moyen du spectromètre Raman RM 3000, dont la résolution spectrale était de $0,2 \text{ cm}^{-1}$ (Information du manufacturier).

Les paramètres d'utilisation étaient les suivants :

- Le laser avait une longueur d'onde 782 nm.
- La puissance à la sortie du laser était autour de 25 mW

- Le temps d'exposition était de une seconde ou soixante seconde selon l'étude
- L'objectif de grossissement était 50 à courte distance ou 100 à courte distance
- L'ouverture de la fente était 50 μm .
- Un pic de silice servait de référence pour le réglage. Sa position et son intensité étaient vérifiés avant chaque expérience. Sa position devait être 520 cm^{-1} pour une intensité qui pouvait être par exemple 10 905 coups, selon la puissance du laser.
- Les plages des spectres étaient échelonnées de 200 cm^{-1} à 2000 cm^{-1} .

Plusieurs compositions de microsphères étaient évaluées par la spectroscopie Raman :

- Les microsphères de PLA (49 898 PM) sans PEG-1540 distéarate :
 - o Les microsphères de PLA, avec des taux croissant de Captopril : 5 % ; 10 % ; 20 % ; 35 %.
 - o Les microsphères de PLA, avec des taux croissant de L-158,809 : 5 % ; 10 % ; 20 % ; 35 %.
- Les microsphères de PLA (49 898 PM) avec PEG-1540 distéarate :
 - o Les microsphères de PLA, dont le ratio Polymère sur Captopril était dix (ratio 9/1), avec des taux croissant de microencapsulation de PEG-1540 distéarate : 7,4 % ; 13,79 %,
 - o Les microsphères de PLA, dont le ratio Polymère sur L-158,809 était quatre (ratio 4/1), avec des taux théoriques croissant de microencapsulation de PEG-1540 distéarate : 3,84 % ; 7,4 % ; 10,71 % ; 13,79 %
- Les microsphères de PLGA (48 000 PM) sans PEG-1540 distéarate :
 - o Les microsphères de PLGA, avec des taux théoriques croissant de dexaméthasone : 5 % ; 10 % ; 20 % ; 35 %.

Une évaluation par la spectroscopie Raman de toutes les substances entrant dans la composition des microsphères était effectuée.

Dans le cadre des études pour contrôler la fiabilité des signaux Raman, le nombre de spectre enregistrés à la même position sur la surface des échantillons de microsphères était

six. Pour chaque spectre, les intensités des pics d'intérêt étaient recueillies et une intensité moyenne était calculée pour le pic en question, pour l'ensemble des six spectres.

Pour contrôler l'uniformité en principe actif à la surface des microsphères, les spectres étaient enregistrés à au moins six positions différentes sur la surface des échantillons de microsphères. De la même façon, pour chaque spectre, les intensités des pics d'intérêt étaient recueillies et une intensité moyenne était calculée pour le pic en question, pour l'ensemble des six spectres. Pour chaque pic d'intérêt, il a été déterminé une moyenne, un écart type, une erreur type et un coefficient de variation. L'erreur type est le rapport de l'écart type sur la racine carrée de l'effectif, autrement dit le nombre de mesure répétée. Le coefficient de variation (C.V.) est le rapport de l'écart type sur la moyenne, multiplié par cent.

Lorsqu'il a été question de calculer la limite de détection et la limite de quantification, il a été procédé de la façon suivante : Si le signal du pic est notée S , en l'absence d'autres sources de bruit, la déviation standard du signal (σ_S) est alors donnée

par la limite du bruit propre à ce signal (*signal shot noise*) : $\sigma_S = \sqrt{S}$.

Cette limite de bruit propre au signal est importante en spectroscopie et survient lorsque le comptage est gouverné par la statistique de Poisson ^[270]. Pour simplifier, il s'agit de comprendre que la précision relative au signal est améliorée lorsque la durée de la mesure est augmentée puisqu'il y aura alors plus de photons (diffusion Raman) enregistrés. Ainsi de la même manière, en l'absence du signal du pic d'intérêt, la mesure du bruit de fond moyen S_b , au même emplacement que le pic d'intérêt permet de calculer la limite de détection et la limite de quantification.

- **La limite de détection (*LOD ou limit of detection*)** correspond au plus petit signal du pic d'intérêt, qui peut être détecté dans l'échantillon. La LOD n'est en fait pas nécessairement quantifiable : $LOD = S_b + 3 \cdot \sigma_b$
- **La limite de quantification (*LOQ ou limit of quantification*)** correspond au plus petit signal du pic d'intérêt, qui peut être quantifié dans l'échantillon avec une

précision acceptable. La LOD est en fait un compromis entre la quantité et la précision requise ainsi que l'exactitude. Par exemple, si la précision requise est grande alors la LOQ sera élevée puisqu'il y aura plus de quantité rapportée.

La LOQ peut être obtenue de la façon suivante : $LOQ = S_b + 10 \cdot \sigma_b$

La Figure III-2.1-1 illustre la relation entre la distribution de l'erreur dans la mesure du bruit de fond à l'emplacement du pic d'intérêt, la limite de détection et la limite de quantification.

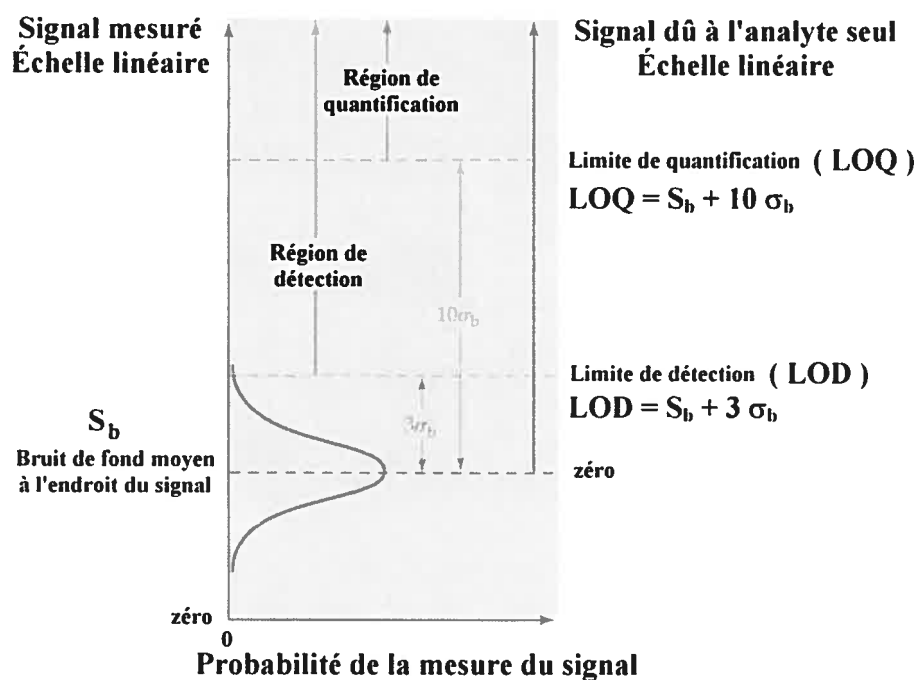


Figure III - 2.1-1 Distribution de l'erreur dans la mesure du bruit de fond, la limite de détection et la limite de quantification (Adaptée de Robinson, J. F. et Robinson, K. A., 1998 ^[271]).

III - 2.1.2.6 Étude de libération in vitro

Les études, in vitro, de libération de médicament à partir des microsphères étaient réalisées, avec l'aide d'un bain à agitation mécanique et thermostaté, de la façon suivante : Une quantité 10 mg de microsphères, correspondante à une quantité connue en médicament microencapsulé, était placée dans 150 ml (voire 250 ml) de tampon phosphate pH 7,4 , thermostaté à 37 °C et sous agitation. Le volume était suffisamment grand pour que les études puissent s'effectuer le mieux possible en condition sink. Des volumes de 10 ml d'échantillons y étaient prélevés à différents intervalles de temps, puis centrifugés durant 5 minutes à 3000 tours par minute. Le surnageant était analysé au spectrophotomètre UV-visible, à la longueur d'onde maximale du médicament à doser, dans le tampon phosphate pH 7,4. Le culot était toujours remis dans le milieu d'origine (contenant les microsphères). Le surnageant ou un volume équivalent en tampon phosphate était aussi placé dans le milieu d'origine. La valeur de l'absorbance obtenue pour chaque volume d'échantillon était alors comparée aux données d'une droite standard (absorbance versus concentration) établie pour le même médicament, en solution dans le tampon phosphate pH 7,4, à 37 °C, dans le but de déterminer la quantité expérimentale de médicament libéré des microsphères. Cette droite standard était la courbe de l'absorbance mesurée en fonction de la concentration connue du médicament dans le tampon phosphate pH 7,4 , à 37 °C et son coefficient de corrélation devait être toujours proche de 0,99. Les médicaments choisis étaient le L-158,809, dont la longueur d'onde d'absorption maximale dans le tampon phosphate pH 7,4 , à 37 °C, était 286 nm et le Captopril, dont la longueur d'onde d'absorption maximale dans le tampon phosphate pH 7,4 , à 37 °C, était 244 nm. Les microsphères, utilisées dans les études de libération in vitro de médicament, avec L-158,809 , étaient constituées de PLA, de PEG-1540 distéarate. Leurs caractéristiques étaient les suivantes :

- Le polymère PLA était défini ainsi :
 - ratio 50/50 : 50 % de PLA 73 405 PM et 50 % de PLA 43 556 PM,
 - ratio 60/40 : 60 % de PLA 73 405 PM et 40 % de PLA 43 556 PM,

- Le ratio polymère sur PEG-1540 distéarate était huit (ratio 8/1).

Les pourcentages théoriques de charge en médicament dans les microsphères étaient :

- Avec les formulations PLA 50-50 et PLA 60-40 : 10 % et 20 % de L-158,809,
- Avec la formulation PLA 66 815 PM : 20 % de L-158,809 et/ou 20 % de Captopril

III - 2.2 Études in vivo

Les protocoles des études, in vivo, étaient approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada) et étaient effectués selon les principes et les pratiques du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

III - 2.2.1 Procédure d'angioplastie

La procédure d'angioplastie, pour occasionner la resténose, est identique à chaque étude *in vivo*. Tous les animaux étaient pesés, puis anesthésiés avec une injection intrapéritonéale d'une solution mixte de kétamine-Xylazine, selon les concentrations respectives 87 mg/kg et 13 mg/kg. La chirurgie, pour dégager les artères carotidiennes, fut procédée sur les animaux endormis. Pour occasionner la resténose dans les artères carotides externes, une procédure d'angioplastie par dilatation au ballonnet était pratiquée selon la technique de Laporte et Escher (1992)^[272] par le Dr. Dung Pham. En résumé, après le dégagement des artères, un cathéter à ballonnet fut introduit dans la carotide gauche externe jusqu'au niveau de la crosse aortique puis gonflé et un mouvement en vrille, aller-retour, était effectué à cet endroit afin de provoquer le dommage endothélial de l'artère sur une longueur artérielle dépassant cinq centimètres. La procédure d'angioplastie était répétée au moins trois fois avant la ligature définitive de l'artère carotidienne gauche externe.

III - 2.2.2 Administration des agents thérapeutiques

Les administrations des microsphères, avec ou sans agents thérapeutiques, ont été effectuées par dépôt périvasculaire, autrement dit il s'agit d'une administration par la voie adventitielle. Les deux modèles de médicament ont été le L-158,809 et le Captopril. Une quantité de 50 mg de microsphères, avec ou sans médicament selon le groupe de rats, était alors déposée tout autour de la paroi externe de l'artère carotidienne externe gauche, après que cette artère ait subi la procédure d'angioplastie. Une fois le dépôt effectué, il fut procédé à la fermeture de la plaie par des coutures successives par plans, d'abord musculaires puis cutané.

III - 2.2.2.1 Étude avec le L-158,809

Deux formulations de microsphères ont été employées, celle avec le PLA 50/50 et celle avec le PLA 60/40. Chaque groupe d'animaux est composé d'au moins six rats. Deux groupes de rats ont servi de témoins : Un groupe témoin, sans angioplastie et sans traitement et un groupe témoin, avec angioplastie et sans traitement, c'est à dire n'ayant pas eu de microsphères.

Pour chaque formulation, trois groupes de rats ont été formés

- Un groupe témoin avec angioplastie, ayant eu que des microsphères, dépourvues de L-158,809 (groupe 0 % L-158,809 PLA).
- Un groupe traité avec angioplastie, ayant eu une dose de 10 % de L-158,809 microencapsulé dans une formulation de PLA (groupe 10 % L-158,809 PLA).
- Un groupe traité avec angioplastie, ayant eu une dose de 20 % de L-158,809 microencapsulé dans une formulation de PLA (groupe 20 % L-158,809 PLA).

III - 2.2.2.2 Étude de bi-médication avec L-158,809 et Captopril

Trois groupes de rats ont été formés :

- Un groupe traité avec angioplastie, ayant eu une dose de 20 % de L-158,809 microencapsulé dans une formulation de PLA 66 815 PM (groupe 20 % L-158,809).
- Un groupe traité avec angioplastie, ayant eu une dose de 20 % de Captopril microencapsulé dans une formulation de PLA 66 815 PM (groupe 20 % Captopril).
- Un groupe traité avec angioplastie, ayant eu une dose de 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril microencapsulés dans une formulation de PLA 66 815 PM (groupe 20 % L-158,809 et 20 % Captopril).

III - 2.2.3 Réparation et analyse morphométriques des artères

L'euthanasie des animaux et la procédure de fixation des artères a été effectuée selon la technique de Laporte et Escher (1992)^[272] par le Dr Dung Pham et le service de Pathologie de l'Université de Sherbrooke. En résumé, le quatorzième jours après l'angioplastie, les animaux étaient fixés par perfusion avec une solution composée de cacodylate 0,1 M pH 7,4 , de formaldéhyde 1,0 % et de glutaraldéhyde 1,25 %, sous une pression de 100 mm de mercure. Ensuite, les artères carotidiennes communes furent prélevées puis enveloppées de paraffine avant la procédure de coupes histologiques. Les coupes des sections artérielles ont été effectuées à trois endroits au niveau de la partie artérielle où les microsphères ont été déposées, de manière à fournir une moyenne de la section de l'artère à cet endroit. Trois sections artérielles étaient donc sélectionnées puis photographiées. Enfin, à l'aide du système Bioquant d'analyse d'image et de morphométrie, le Dr. Dung Pham a obtenu les surfaces de coupes des sections artérielles. Ces données brutes devaient servir par la suite à l'évaluation de la prolifération néo-intimale.

La Figure III – 2.2-1 montre les différentes données recueillies à partir des coupes des artères. Trois paramètres ont été évalués dans le cadre de cette recherche : la surface de la lumière artérielle, le paramètre de prolifération néo-intimale et le ratio Intima sur Média. Chacun des paramètres était normalisé par rapport à l'artère elle-même tel que montré dans la Figure III – 2.2-1, de façon à tenir compte des variabilités individuelles.

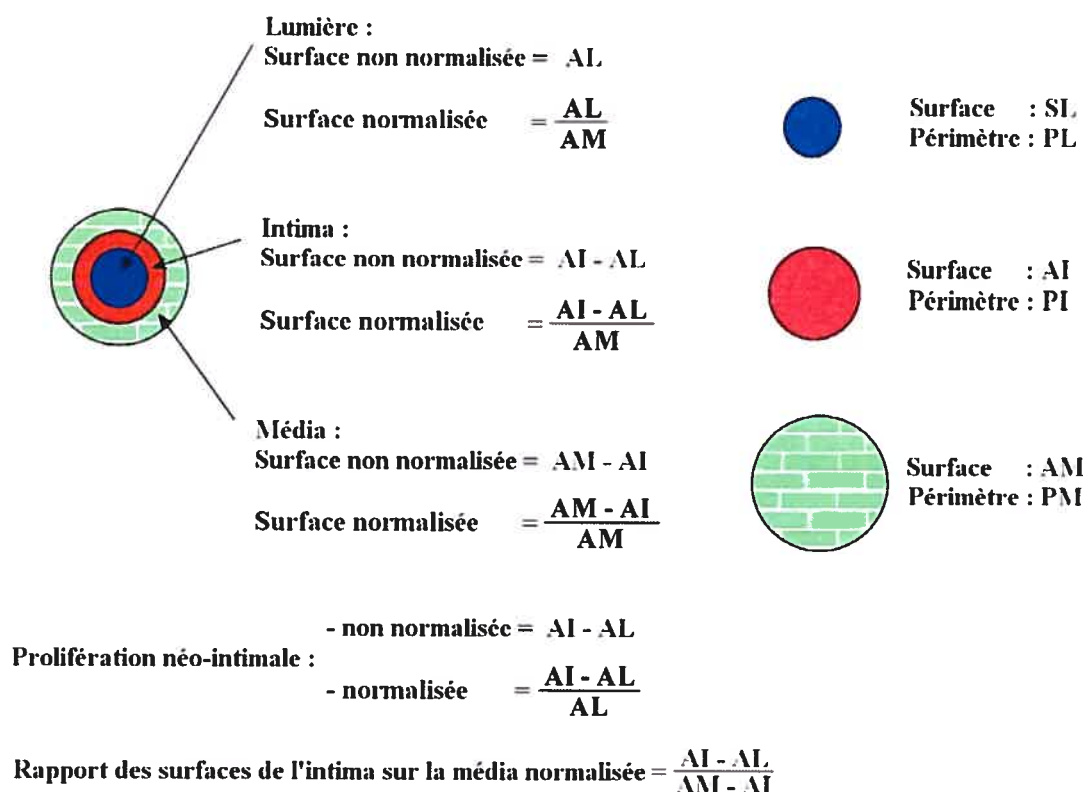


Figure III - 2.2-1 Méthodes d'obtention des paramètres évalués dans les études in vivo

III - 2.2.4 Analyse statistique

Après l'analyse morphométrique des artères, il fut procédé à l'analyse statistique des données recueillies pour chaque série d'expérience. Pour chaque série d'expérience, le

test de l'analyse des variances à un caractère de classification (*ANOVA one way*) a été judicieusement appliqué pour évaluer les caractères suivants : la surface luminale, la prolifération néo-intimale et le ratio intima sur média. Les tests statistiques ont été rendus possibles et grandement facilités avec l'utilisation du logiciel OriginPro, version 7, de OriginLab Corporation (USA).

Les tests statistiques ont été effectués en trois étapes et rapportés de la façon suivante :

- Les sommaires des statistiques qui permettent d'avoir pour le caractère évalué (par exemple la surface luminale) :
 - o Les effectifs pour chaque groupe de rats.
 - o La moyenne, l'écart type et l'erreur type du caractère évalué pour chaque groupe de rats.
 - o L'hypothèse nulle et l'hypothèse alternative.
 - o L'analyse de la variance à un caractère de classification qui donne la conclusion du test pour le caractère évalué.
- Le test de Levène pour l'égalité des variances.
- Le test de Scheffé pour des comparaisons multiples entre les groupes pour le paramètre évalué.

L'analyse statistique concernait les données sur les caractères évalués suivants : la surface normalisée de la lumière artérielle (SN), l'indice de prolifération néo-intimale normalisé (PN) et le ratio normalisé de la surface de l'intima sur la surface de la média (RN).

Afin de pas rendre fastidieuse la lecture du document, un rappel des notions statistiques est présenté dans à l'Annexe VII-B. Les résultats des tests de comparaisons multiples des moyennes pour le caractère évalué, sont présentés dans la partie IV – Résultats et Discussion mais le détail complet de ces tests se trouvent dans la partie VII aux Annexes G, H et I. De manière pratique, par le test de Scheffé, il est généré une différence entre les moyennes de deux groupes comparés ainsi qu'un intervalle de confiance simultané avec une limite supérieure et une limite inférieure. Puisque l'hypothèse nulle correspond à

l'égalité des moyennes comparées, les tests en question se concluent de la manière suivante, pour un seuil de signification, noté P , donné (par exemple 0,05) ^[273]:

- **Si la valeur zéro se trouve incluse dans l'intervalle de confiance simultané** alors il n'y a pas de différence significative entre les moyennes comparées, pour le seuil de signification choisi, autrement dit l'hypothèse nulle ne peut pas être rejetée au seuil de signification en question.

Exemple :

Dans le cas de l'étude du dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809, l'application numérique donne :

- *La moyenne de la surface luminale normalisée du groupe A (0 % de L-158,809) est 0,4375*
- *La moyenne de la surface luminale normalisée du groupe B (10 % de L-158,809) est 0,4584*

Le test de Scheffé génère au seuil de risque de 5 % :

- *la différence entre les deux moyennes est $-0,0209$.*
- *La limite inférieure de l'intervalle de confiance simultané est $-0,1787$*
- *La limite supérieure de l'intervalle de confiance simultané est $0,1369$*

Par conséquent :

- *La valeur zéro est comprise dans les limites de l'intervalle de confiance simultané*

Conclusion :

- *Il n'y a pas de différence significative au seuil de risque de 5 %, entre les deux moyennes, autrement dit l'hypothèse nulle ne peut pas être rejetée.*

- **Si la valeur zéro n'est pas incluse dans l'intervalle de confiance simultané** alors il y a une différence significative entre les moyennes comparées, pour le seuil de signification choisi, autrement dit l'hypothèse nulle est rejetée au seuil de signification en question.

Exemple :

Dans le cas de l'étude du dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809, l'application numérique donne :

- *La moyenne de la surface luminale normalisée du groupe C (20 % de L-158,809) est 0,6071*
- *La moyenne de la surface luminale normalisée du groupe D (angioplastie et sans traitement) est 0,3939*

Le test de Scheffé génère :

- *la différence entre les deux moyennes est 0,2131*
- *La limite inférieure de l'intervalle de confiance simultané est 0,0584*
- *La limite supérieure de l'intervalle de confiance simultané est 0,3678*

Par conséquent :

- *La valeur zéro n'est pas comprise dans les limites de l'intervalle de confiance simultané*

Conclusion :

- *Il y a une différence significative au seuil de risque de 5 %, entre les deux moyennes, autrement dit l'hypothèse nulle peut être rejeté : les deux moyennes sont différentes au seuil de risque de 5 %*

IV Résultats et discussion

Après la microencapsulation de principe actif par nébulisation, viennent les études de caractérisation physique et physico-chimique des microsphères obtenues. Quant aux études *in vivo*, elles traitent de l'utilisation des microsphères comme outils de vectorisation pour des modèles pharmacologiques tels que le L-158,809 et le Captopril dans le traitement de la resténose, au travers du spectre de l'inhibition de la prolifération néo-intimale artérielle. Les évaluations *in vivo* visent avant-tout à vérifier le potentiel de libération des principes actifs hors de la matrice polymérique des microsphères. Compte tenu de l'aspect de technologie pharmaceutique de la présente recherche, les évaluations *in vivo* n'avaient pas pour finalité le développement d'un traitement pharmacologique de la restenose.

IV - 1 La production des microsphères

La production des vecteurs micro-particulaires par nébulisation est un procédé fiable et rapide pour générer des microsphères, notamment lorsque des principes actifs, comme le L-158,809 ou le Captopril, ainsi que l'excipient polymérique, l'acide poly-lactique (PLA), sont solubles dans le solvant de nébulisation.

IV - 2 Caractérisations des microsphères *in vitro*

Les caractérisations des microsphères englobent plusieurs aspects dans le but de répondre aux objectifs énoncés précédemment.

IV - 2.1 Évaluation de l'efficacité d'encapsulation par nébulisation

La littérature rapporte que la méthode de nébulisation (*spray-drying*) permet d'obtenir des microsphères avec un taux de rendement d'encapsulation beaucoup plus élevé que celui obtenu par les autres méthodes telles que l'évaporation ou l'extraction de solvant.

Nom des microsphères		Taux théorique du médicament dans les microsphères (en %)	Taux expérimental du médicament dans les microsphères (en %)	Rendement de la microencapsulation par nébulisation (en %)
médicament dosé	Constituants des microsphères			
L-158,809	PLA 50/50	10	9.62	96.20
	PLA 50/50	20	18.95	94.75
	PLA 50/50	30	28.85	96.16
	PLA 60/40	10	9.59	95.90
	PLA 60/40	20	19.34	96.70
	PLA 49 898 PM	5	4.86	97.20
		10	9.78	97.80
		20	19.03	95.15
		35	34.23	97.80
	PLA 49 898 PM et PEG-1540 distéarate (ratio PLA sur L-158,809 : 4/1)	19.23	18.24	94.85
		18.51	17.23	93.08
		17.85	16.29	91.26
		17.24	16.12	93.50

Tableau IV - 2.1-1 Teneur en L-158,809 dans différentes formulations de microsphères, nébulisées, de PLA et comparaison des rendements des microencapsulations.

L'Annexe VII-C rapporte les spectres d'absorption du L-158,809 (Annexe C - VII-3.1) et du Captopril (Annexe C - VII-3.2) dans le THF, par spectrophotométrie UV-visible. Ces spectres avaient été obtenus dans le but de choisir la longueur d'onde d'absorption maximale à laquelle les principes actifs étaient dosés. Afin d'illustrer la grande efficacité de la microencapsulation par nébulisation, la microencapsulation du L-158,809 dans du PLA est considéré comme exemple car il en est de même pour celle du Captopril. Les résultats obtenus par la microencapsulation de L-158,809 dans du PLA, avec ou sans PEG-1540 distérate sont illustrés dans le Tableau IV - 2.1-1 et semblent confirmer les données de la littérature. En effet, le taux de rendement d'encapsulation du L-158,809 est supérieur à 93 % et pourrait être expliqué par le fait que ce principe actif et le polymère PLA sont totalement solubles dans le dichlorométhane. En d'autres termes, le L-158,809 et le PLA sont uniformément répartis dans le mélange organique, composé de dichlorométhane, de PLA et de L-158,809, avant que ce dernier soit nébulisé.

IV - 2.2 Analyse granulo-morphologique des microsphères

L'analyse granulo-morphologique est effectuée en trois étapes : l'analyse qualitative des microsphères par microscopie électronique, la détermination de la taille par spectroscopie de corrélation de photons et l'analyse par microscopie à force atomique (AFM)

IV - 2.2.1 Analyse par microscopie électronique

La microscopie électronique est une bonne approche qualitative pour visualiser la morphologie générale des microparticules et pouvoir ainsi apprécier la qualité du processus de nébulisation à former des microsphères. À cette fin, des photographies de microscopie électronique ont été prises sur plusieurs formulations de microsphères, dont les plus représentatives sont offertes dans les figures suivantes : Figures IV- 2.2-1, IV- 2.2-2, IV – 2.2-3, IV – 2.2-4 et IV – 2.2-5.

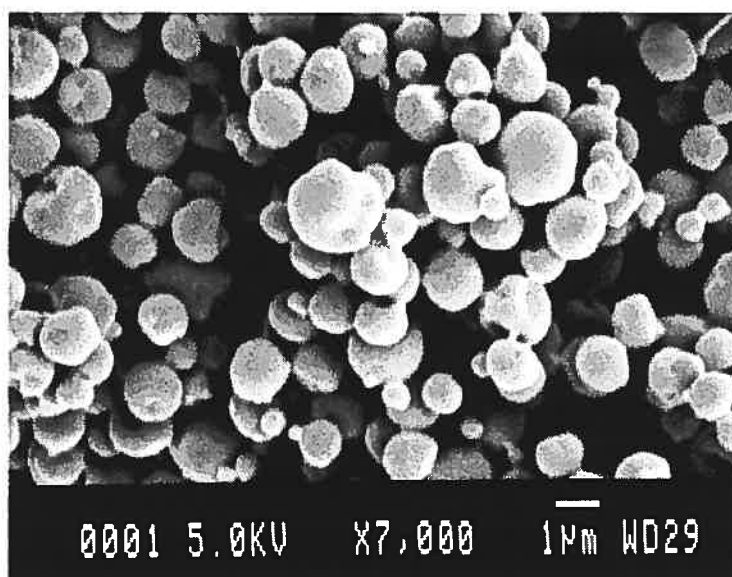


Figure IV - 2.2-1 Photomicrographie de microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 20 %).

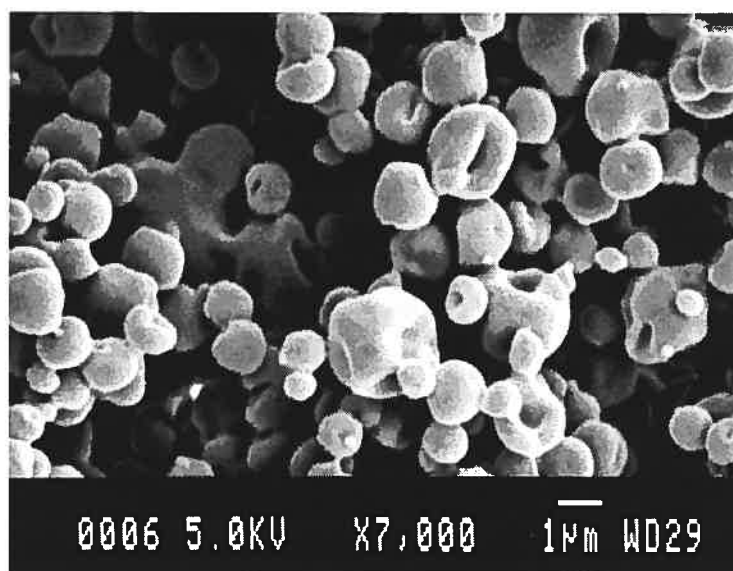


Figure IV - 2.2-2 Photomicrographie de microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 10 %).

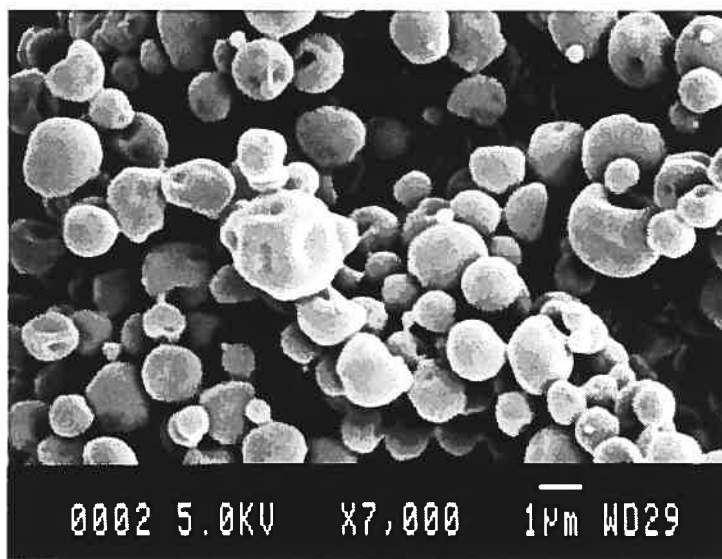


Figure IV - 2.2-3 Photomicrographie de microsphères d'un mélange de PLA (73 405 PM) et PLA (43 556 PM) (ratio respectif 50/50), avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 20 %).

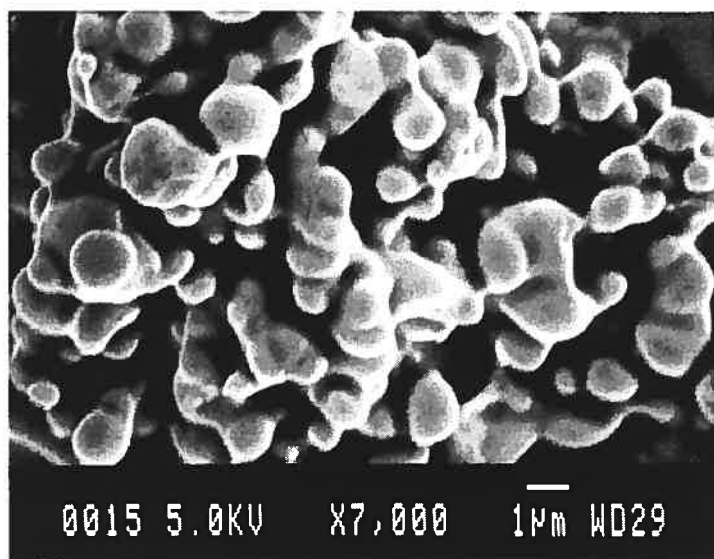


Figure IV - 2.2-4 Photomicrographie de microsphères d'un mélange de PLA (73 405 PM) et PLA (43 556 PM) (ratio respectif 60/40), avec PEG-1540 distéarate et L-158,809 (teneur 20 %).

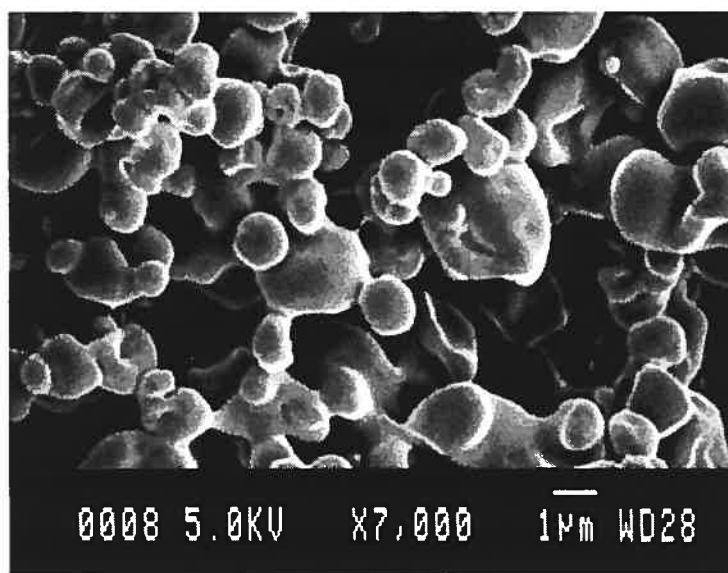


Figure IV - 2.2-5 Photomicrographie de microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate et Captopril (teneur 10 %).

Les Figures IV- 2.2-1, IV- 2.2-2, IV – 2.2-3, IV – 2.3-4 et IV – 2.2-5 indiquent que les microsphères de PLA, obtenues par nébulisation, possèdent définitivement une morphologie de nature sphérique. Leurs surfaces paraissent lisses et ne semblent pas posséder de pores visibles. Toutes les photomicrographies par microscopie électronique des microsphères nébulisées montrent que le diamètre de ces microparticules ne semblent pas excéder 3 μm . De plus, les différentes formulations, ainsi que les teneurs variées en médicament, ne semblent guère affecter la morphologie et la taille des microsphères nébulisées. Toutefois, l'observation attentive des photomicrographies indique que la surface de plusieurs microsphères possède des dépressions, donnant l'impression de collapses. Ce phénomène laisse ainsi à penser que les microsphères de nature polymérique, produites par « *spray-drying* », seraient moins denses en leur centre qu'en leur périphérie. Bien que la microscopie électronique fournisse des informations utiles de nature morphologique, ces dernières sont essentiellement de nature qualitative. C'est pourquoi, en vue d'obtenir une meilleure détermination de la taille de ces microparticules, une analyse par spectroscopie de corrélation de photons devait être entreprise.

IV - 2.2.2 Analyse par spectroscopie de corrélation de photons

L'analyseur Coulter N4 permet selon le mode d'analyse SDP (*SDP Analysis*) de recueillir des résultats sous la forme d'histogramme ou sous la forme d'une courbe en cloche des distributions de la taille des particules. La courbe graphique peut être obtenue en terme d'une distribution d'intensité moyenne ou de pondération en fonction de la taille.

De plus, la conversion de la distribution de l'intensité en distribution de poids demande d'utiliser l'équation de Mie, qui requière l'index de réfraction de la particule ou à défaut une conversion approximative, si l'index de réfraction de la particule n'est pas connu^[233]. Puisque l'index de réfraction de la particule n'est pas connu au moment des expérimentations, l'option choisie, pour présenter les distributions de la taille des microsphères, se porte dès lors sur une distribution de l'intensité moyenne de la lumière diffusée en fonction de la taille des microparticules.

Les Figure IV - 2.2-6 et IV - 2.2-7 représentent respectivement la distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) contenant soit 10 % de L-158, 809 ou soit 20 % de L-158,809, à différents angles.

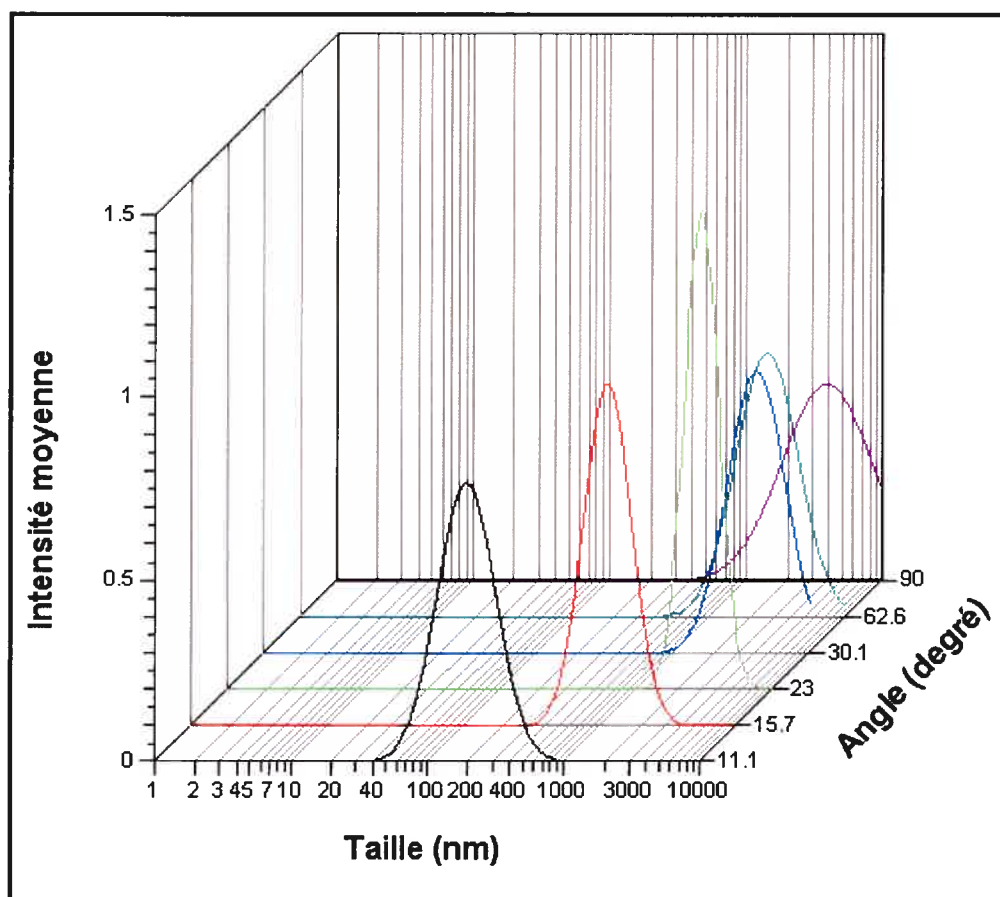


Figure IV - 2.2-6 Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 10 % de L-158, 809, à différents angles.

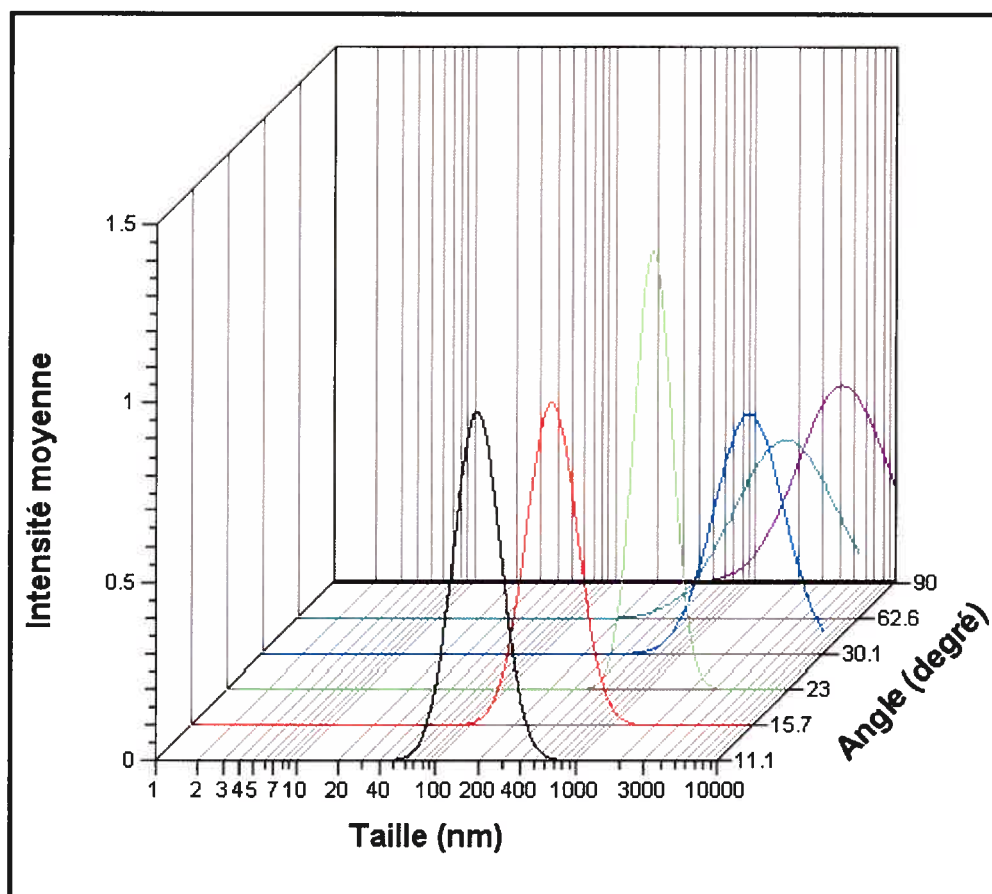


Figure IV - 2.2-7 Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 20 % de L-158, 809, à différents angles (degré).

Les Figure IV - 2.2-8 et IV - 2.2-9 représentent respectivement la distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) contenant soit 10 % de Captopril ou soit 20 % de Captopril, à différents angles.

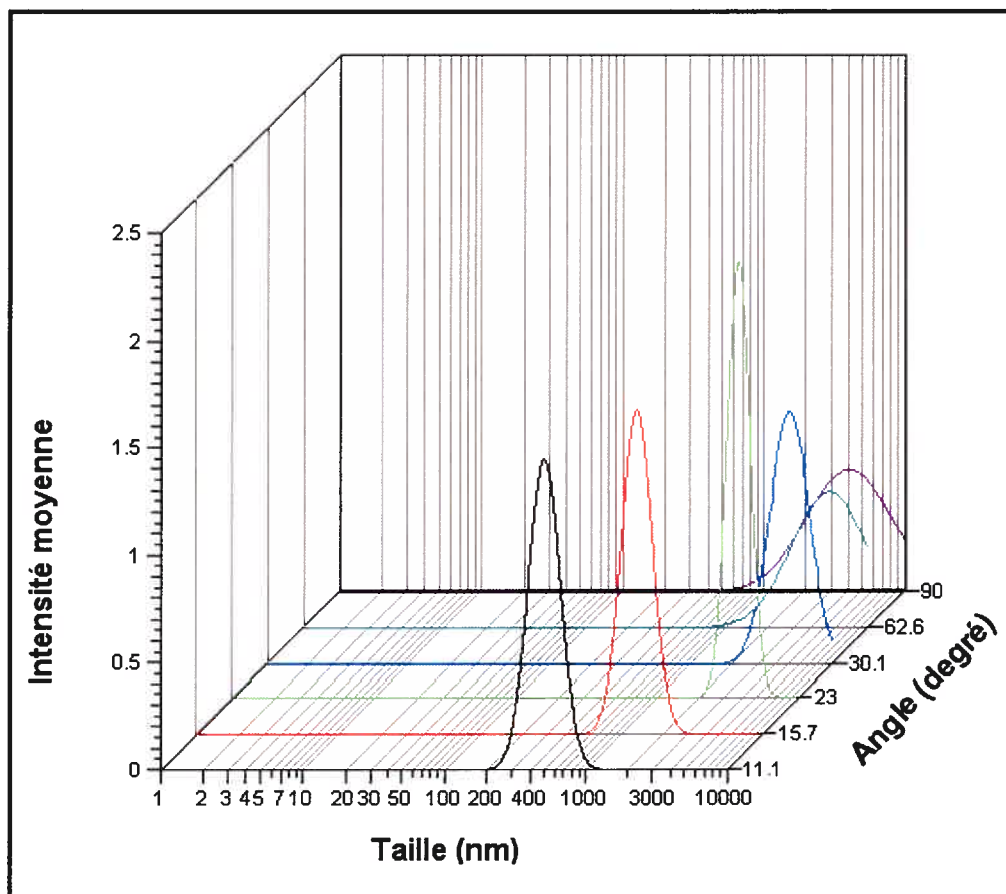


Figure IV - 2.2-8 Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 10 % de Captopril, à différents angles (degré).

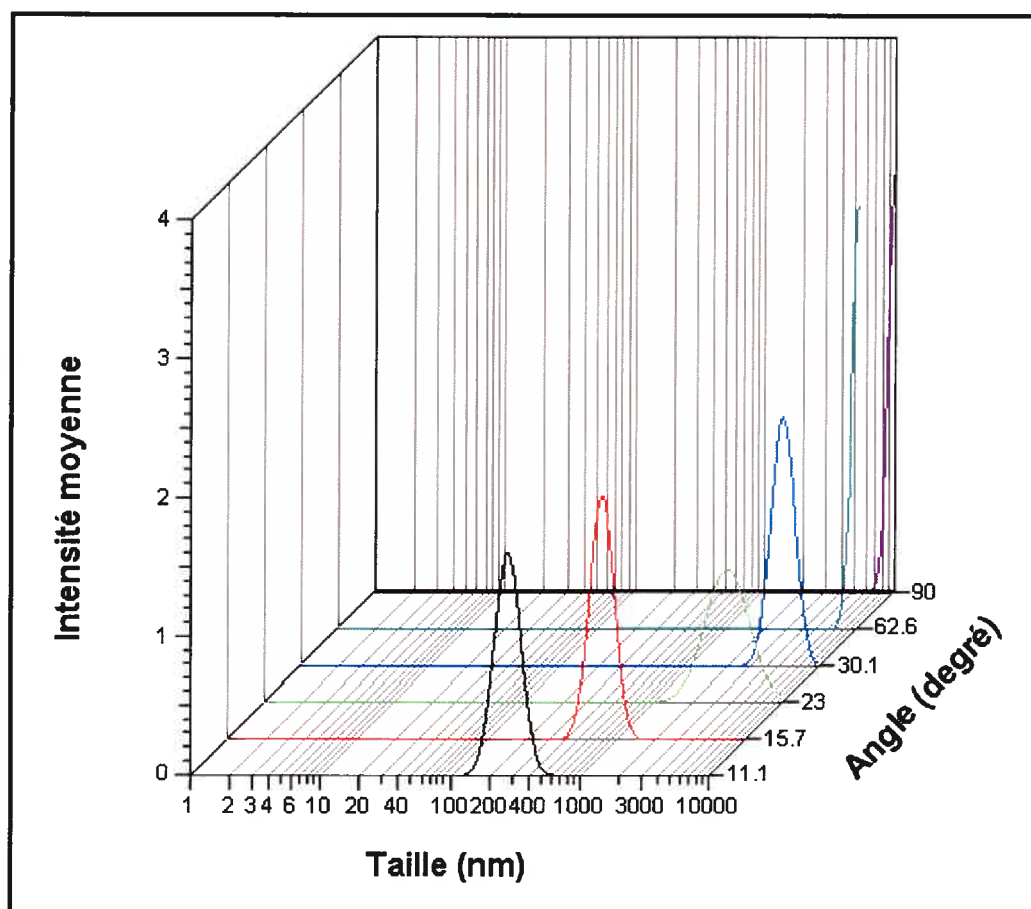


Figure IV - 2.2-9 Distribution de l'intensité moyenne diffusée en fonction de la taille moyenne des microsphères de PLA (49 898 PM) avec 20 % de Captopril, à différents angles (degré).

Ces quatre figures indiquent que lorsque les angles sont $11,1^\circ$, $15,7^\circ$ et 23° , il est possible de détecter trois populations distinctes de microparticules dont la taille moyenne la plus grande observée, semble être de l'ordre de $3\ \mu\text{m}$. Par contre, lorsque les angles deviennent plus grands, c'est à dire $30,1^\circ$, $62,6^\circ$ et 90° , la taille moyenne des particules semble alors être beaucoup plus grande, atteignant même les $10\ \mu\text{m}$.

Pour une explication raisonnable à cette situation, il convient de se rappeler que l'analyse par spectroscopie de corrélation de photons est très précise dans le cas d'échantillons monodispersés mais par contre devient plus délicate lorsque les échantillons sont polydispersés puisque le système procède à une détection simultanée de toutes les catégories de microparticules. Or, selon la loi de Rayleigh sur la diffusion, l'intensité de la lumière diffusée, pour n'importe quel angle, est proportionnelle au carré du volume ou à la puissance sixième du diamètre de la particule ^[232] et dans le cas d'une molécule, elle est :

$$I_s = I_i \cdot \alpha^2 \cdot \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \cdot \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2r^2}$$

avec I_s : intensité de la lumière diffusée

I_i : intensité de la lumière incidente

r : distance de la particule au détecteur

λ : longueur d'onde de la lumière

θ : angle entre la lumière incidente et la lumière diffusée

α : la polarisabilité de la particule dont la formule est la suivante :

$$\alpha = \frac{3 \cdot (m^2 - 1)}{(m^2 + 2)} \cdot \frac{V}{4}$$

où V : volume de la particule

m : indice de réfraction

Par conséquent, dans le cas d'un échantillon polydispersé avec une distribution large, les grosses particules tendent à élever la valeur de la taille moyenne par rapport à la taille moyenne réelle.

Ainsi, bien que toutes les solutions contenant les microsphères aient été soumises aux ultrasons pendant 2 minutes pour détruire toutes grosses aggrégations, la présence d'agrégats de différentes tailles, dans ces préparations, reste toujours possible et

contribuerait alors à basculer les tailles moyennes des microsphères vers des valeurs plus élevées que leurs valeurs réelles.

De plus, la mesure de la taille des particules par le système étant basée sur le mouvement brownien des particules, il est compréhensible que toute influence, d'origine particulière, sur ce mouvement aura sans nul doute une influence directe sur l'analyse de la taille des microparticules. Dans le même sens, toute influence sur le coefficient de diffusion, comme par exemple la présence d'une couche diffuse d'hydratation à la surface des particules ou autour des agrégats, affectera également la mesure de la taille moyenne des microsphères.

Plusieurs déterminations de la taille des microsphères ont également été effectuées pour différentes formulations de PLA, avec ou sans PEG-1540 distéarate, en l'absence ou en la présence de différents teneurs en L-158,809 ou en Captopril. L'Annexe VII-D présente quelques résultats de ces analyses sous la forme de tableau plutôt que sous la forme de graphique pour simplifier la lecture. Comme précédemment, l'observation de l'ensemble des résultats semble indiquer une présence d'agréations, lesquelles tendent à exagérer la taille des microsphères.

Bien que la spectroscopie par corrélation de photons permette de déterminer des tailles de particules, la méthodologie développée dans cette recherche n'a cependant pas permis, probablement par insuffisance de sensibilité, d'évaluer avec assurance la taille des échantillons de microsphères soumis aux analyses. C'est pourquoi, bien que cette méthodologie puisse encore être améliorée, le choix de se tourner vers une autre approche plus appropriée et plus rapide, pour évaluer la taille des microsphères, avec une meilleure assurance, s'est porté sur la technologie du microscope à force atomique.

IV - 2.2.3 Analyse par microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) a été utilisée car elle permet d'avoir une meilleure résolution de l'image des microsphères nébulisées que la microscopie électronique. De plus, compte tenu que la détermination de la taille de ces microsphères par corrélation de photons était biaisée à cause de la présence probable d'aggrégations, l'utilisation de l'AFM devenait alors plus appropriée. Enfin, l'intérêt considérable que possède l'AFM est qu'elle fournit des données numériques à partir des échantillons évalués qui peuvent être aussitôt exploitables, contrairement à la microscopie électronique.

IV - 2.2.3.1 Analyse morphologique et topographique des microsphères

Plusieurs images de la surface des microsphères ont été obtenues grâce au microscope à force atomique Dimension 3100 de Digital Instrument (Santa Barbara, CA, USA).

Les Figures qui sont présentées ci-dessous sont représentatives de l'ensemble des microsphères obtenues par nébulisation.

Les Figures IV-2.2-10, IV-2.2-11, IV-2.2-12, IV-2.2-13 et IV-2.2-14 montrent des microsphères de PLA 49 898 PM nébulisées avec 5 % ou 20 % de L-158,809 microencapsulés. Elles révèlent bien que la forme des microsphères nébulisées est sphérique, avec une surface qui semble lisse et exempte de cristaux de L-158,809.

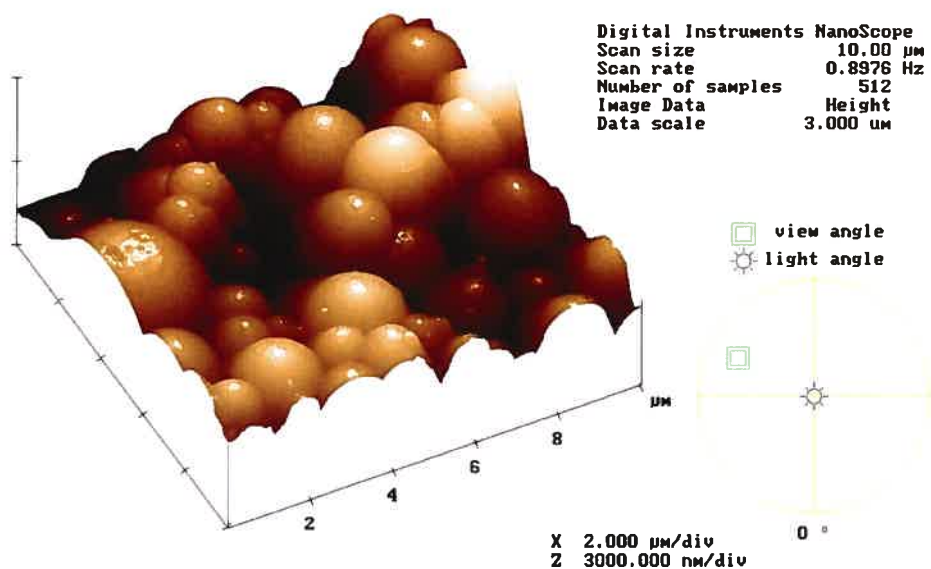


Figure IV - 2.2-10 Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 10 microns).

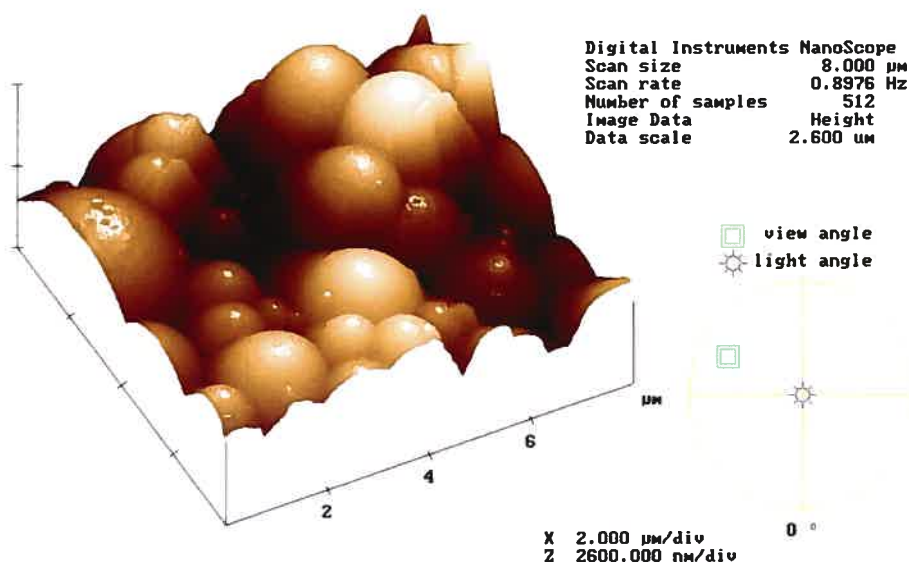


Figure IV - 2.2-11 Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns).

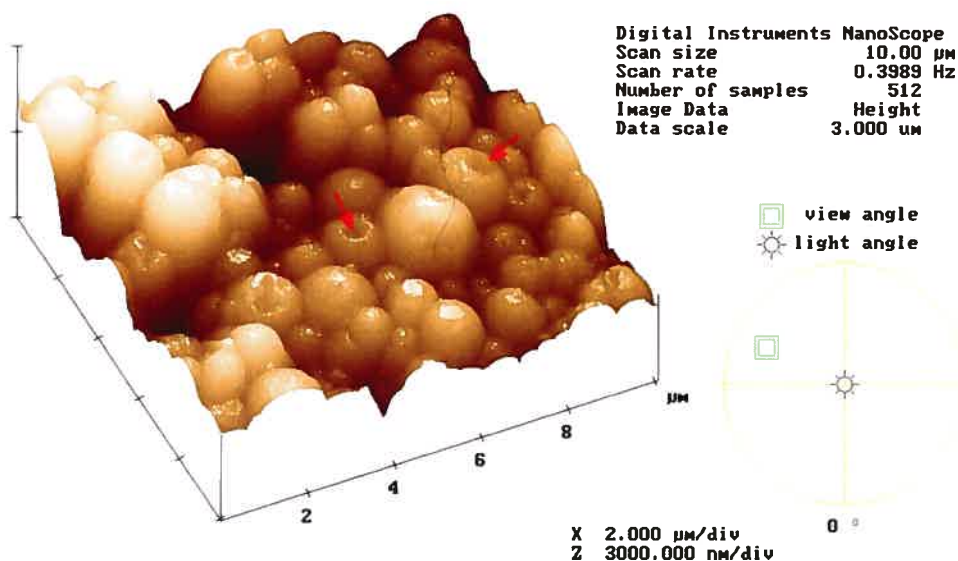


Figure IV - 2.2-12 Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM, composées de PEG-1540 distéarate, avec 20 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 10 microns).

Toutefois, certaines microsphères semblent présenter des dépressions au niveau de leur surface confirmant ainsi les images obtenues par la SEM. Ces collapses donnent l'impression que le centre des microsphères serait moins dense que leur superficie. Il existe une explication possible. Lors du processus de formation des microsphères par nébulisation, l'évaporation rapide du solvant au travers du polymère créerait une pression négative au centre de la sphère polymérique ce qui aurait pour effet de déprimer la surface extérieure, plus dure car déjà sèche, des microsphères, pour équilibrer le déficit en pression. Les Figures IV-2.2-12, IV-2.2-13 et IV-2.2-14 illustrent cette observation (flèches rouges).

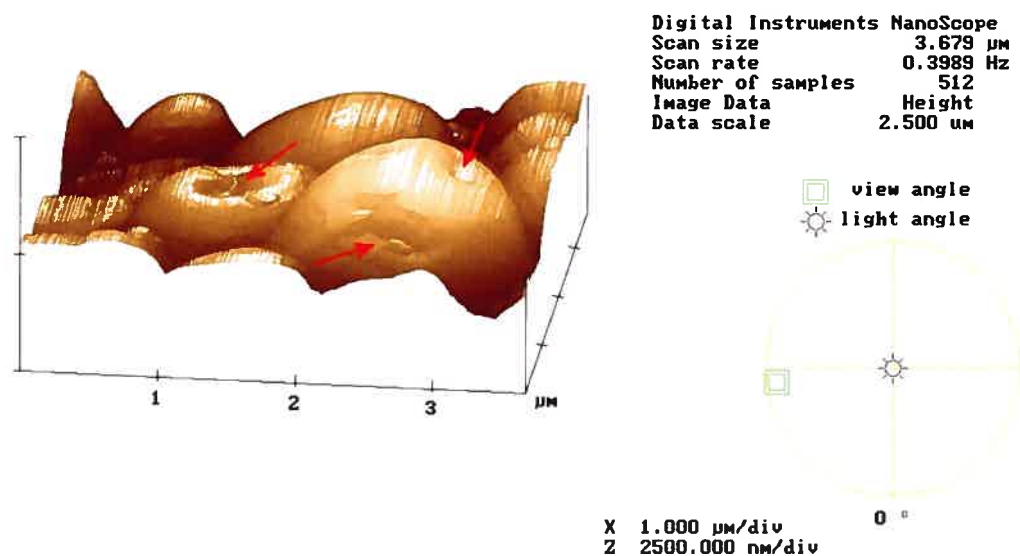


Figure IV - 2.2-13 Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM, composées de PEG-1540 distéarate, avec 20 % de L-158,809 (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 4 microns).

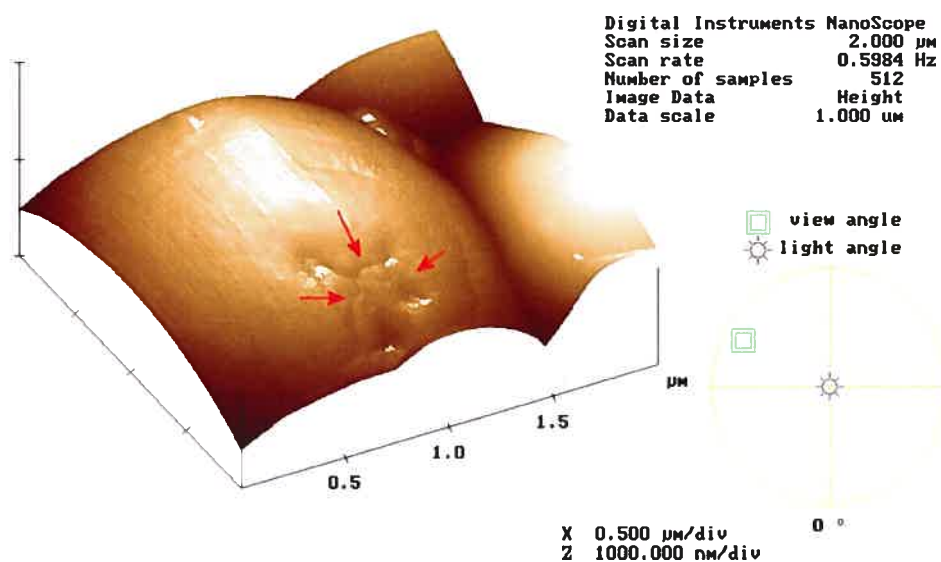


Figure IV - 2.2-14 Topographie par AFM de la surface d'une microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 – Présence de collapses (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 2 microns).

IV - 2.2.3.2 Analyse topographique des microsphères par évaluation de la phase

Il est aussi possible d'analyser la topographie des microsphères en évaluant la phase lors du processus Tapping.

En effet, lorsque l'image de phase des microsphères est observée selon une vue de dessus (Figure IV-2.2-15) plutôt que de côté comme la Figure IV-2.2-16, il est possible de se rendre compte qu'il y a alors une bonne corrélation entre le processus de phase et l'image topographique de la surface des microsphères. En effet, la Figure IV-2.2-15 montre que l'image de phase permet aussi d'avoir une opinion juste de l'état de la surface des microsphères. Cette image de phase est bien corrélée à la Figure IV-2.2-17, car cette dernière est exactement l'image topographique (selon le paramètre de la hauteur) de la même vue que celle présentée pour la phase.

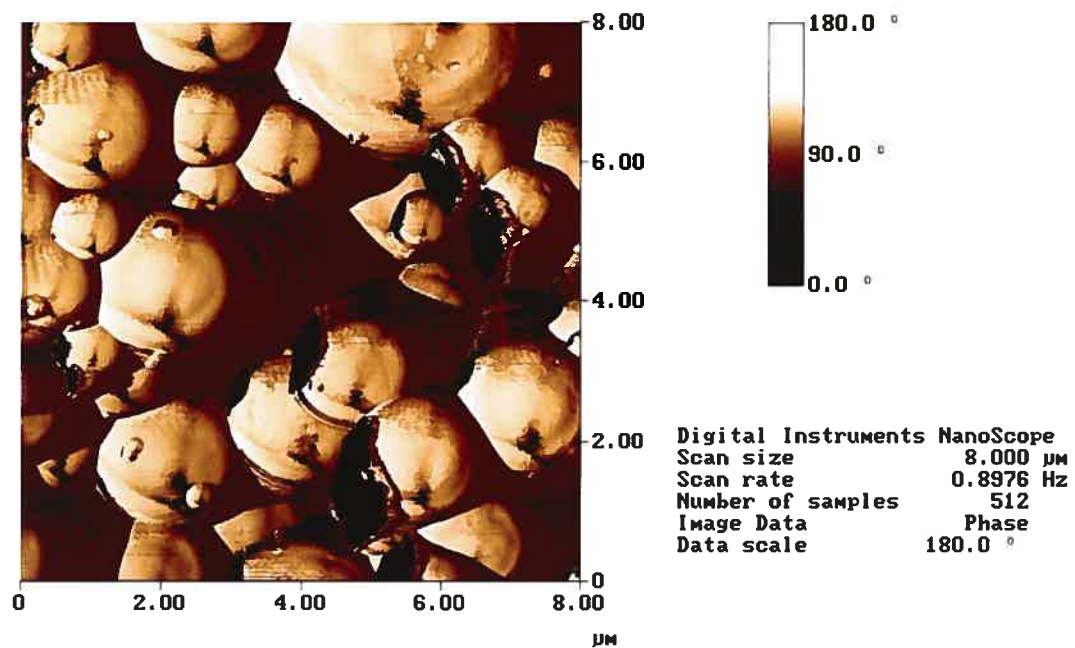


Figure IV - 2.2-15 Image de phase par AFM des microsphères de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon une vue de dessus (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns).

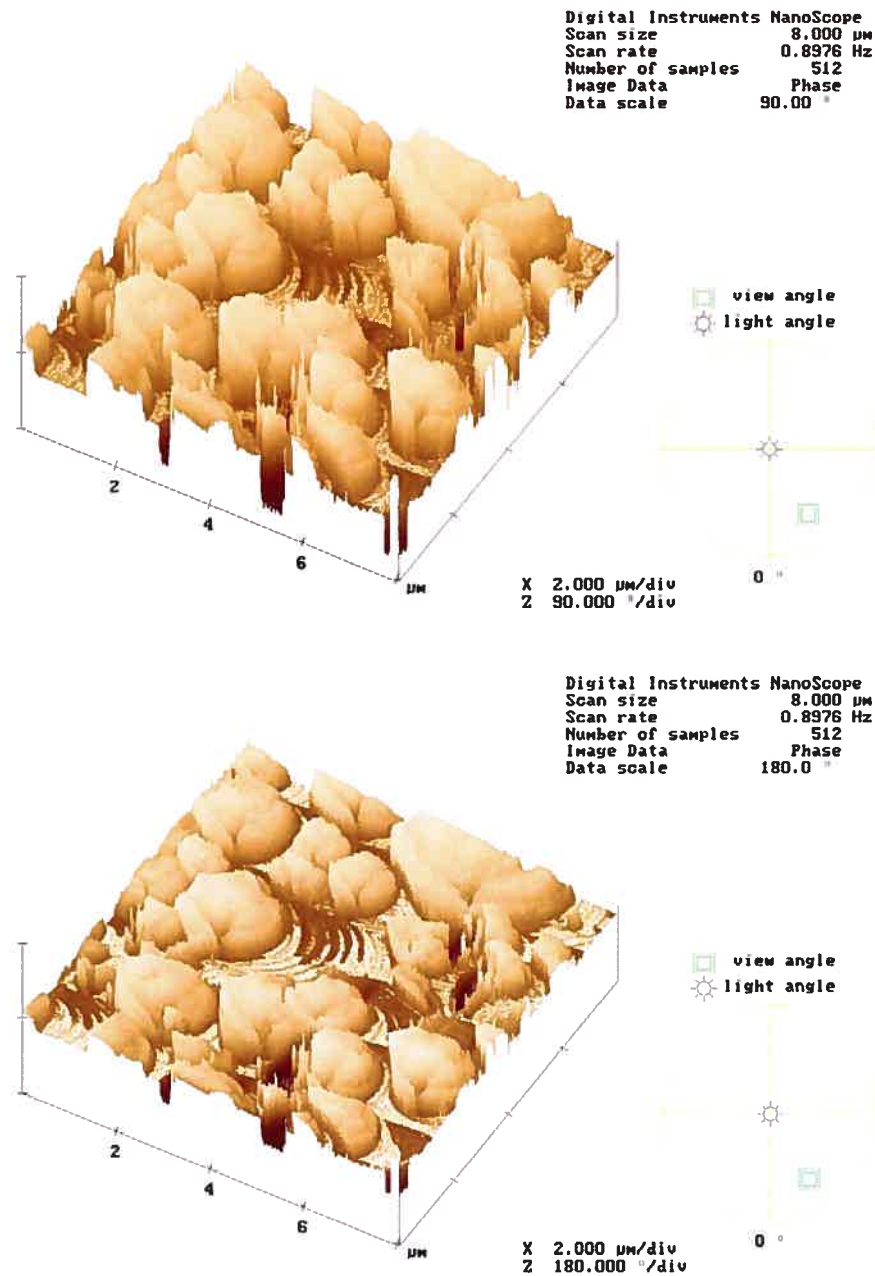


Figure IV - 2.2-16 Images de phase par AFM des microsphères de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon deux vues de côté (rotation 30° et angle 45°) et selon deux échelles de phase (90° et 180°), (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns).

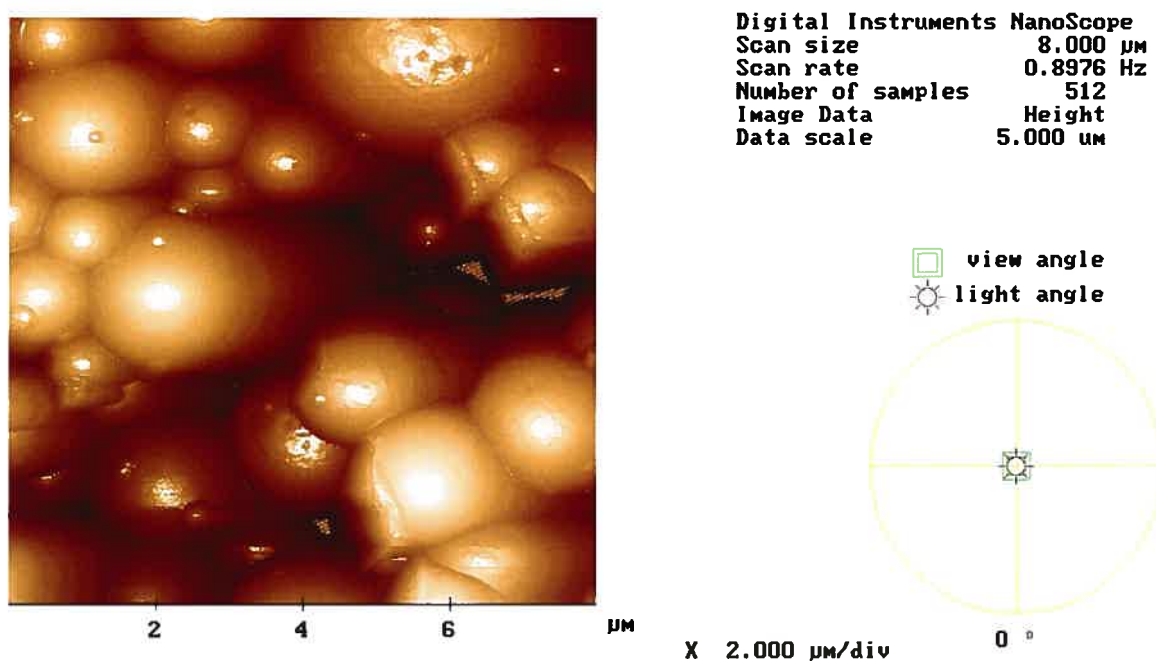


Figure IV - 2.2-17 Topographie par AFM de la surface des microsphères de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon la même vue de dessus que celle présentée pour la phase (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns).

De plus il semble que la surface des microsphères soit significativement uniforme en terme de propriété visco-élastique comme l'illustre la Figure IV-2.2-15 obtenue selon un contact intermittent (*tapping*) moyen et sur laquelle il est possible aussi de constater que la surface des microsphères présente très peu de variation en terme de phase puisqu'elle montre peu de contraste. Cette observation corrobore les explications avancées par Magonov sur la relation entre les contrastes observés sur l'image de phase et les surface des régions observées sur l'image de la topographie de la surface^[274].

Il faut quand même souligner deux observations :

La première observation concerne la région des collapses à la surface des microsphères de PLA qui indique qu'à ce niveau, il y aurait un changement de la visco-élasticité de la surface des microsphères. Il y a donc à cet endroit une ligne de démarcation, révélatrice d'un changement des propriétés visco-élastiques de la surface de la

microsphère. La Figure IV-2.2-18 qui présente une image de phase de la surface d'une microsphère de PLA, contenant 5 % de L-158,809, selon une vue de dessus, avec un affaissement (collapse) à sa surface, illustre parfaitement ce genre de situation. Cette figure peut être corrélée à la Figure IV-2.2-19 qui présente quant à elle la topographie de la surface de la même microsphère de PLA, selon la hauteur.

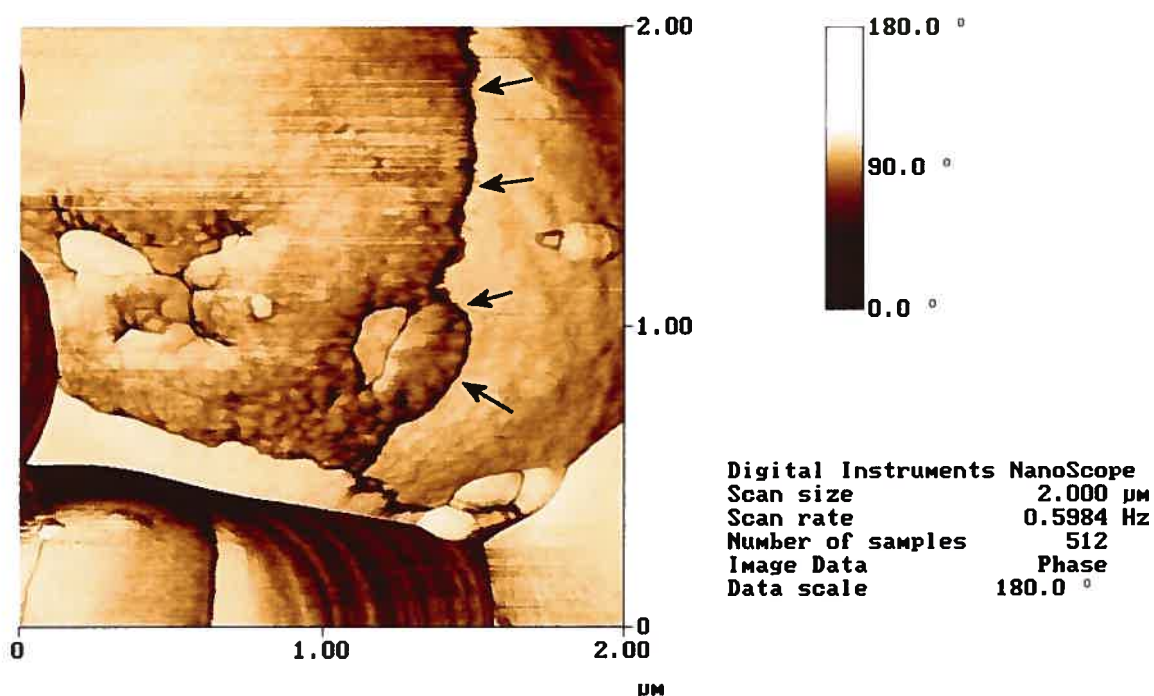


Figure IV - 2.2-18 Image de phase par AFM de la surface d'une microsphère de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon une vue de dessus, présentant une dépression (collapse) à sa surface (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 2 microns).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la ligne de démarcation (flèches noires) est difficilement visible à la surface de la microsphère de PLA dans la Figure IV-2.2-19 de topographie mais l'est par contre pleinement dans la Figure IV-2.2-18 de phase, ce qui démontre ainsi l'avantage certain à exploiter cette caractéristique d'imagerie de l'AFM.

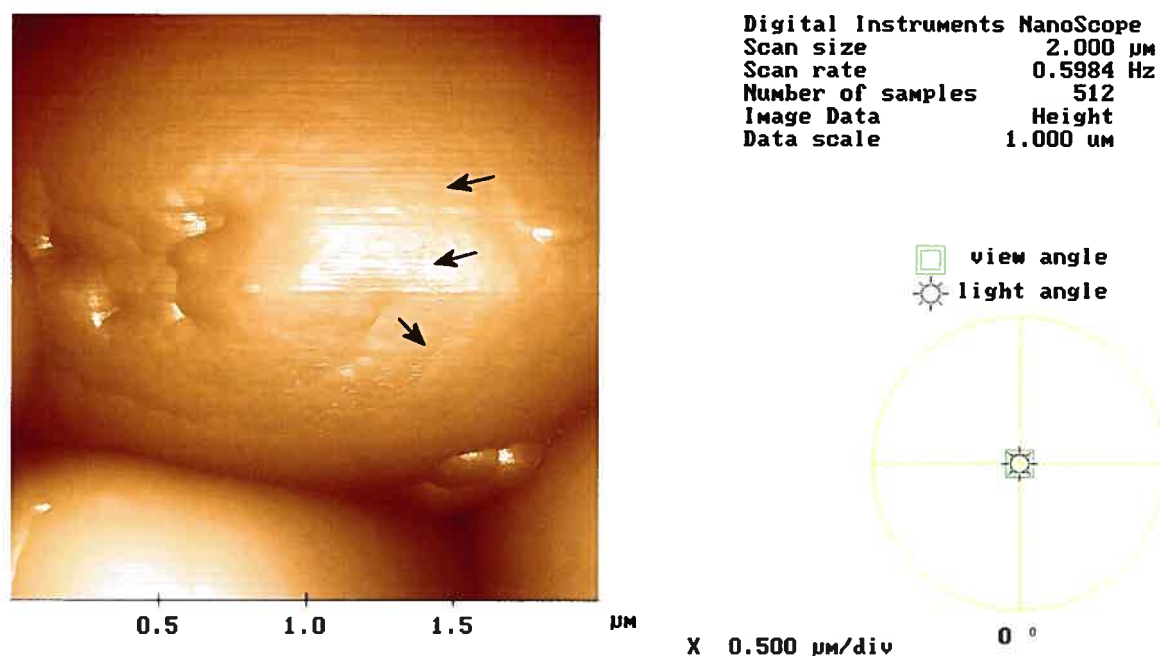


Figure IV - 2.2-19 Topographie par AFM de la surface d'une microsphère de PLA 49 898 PM, contenant 5 % de L-158,809, selon la même vue de dessus que celle présentée pour la phase et présentant une dépression (collapse) à sa surface (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 2 microns).

Lorsqu'une collapse se produit, elle engendrerait une zone de fragilité au niveau de microsphère elle-même, ce qui se traduirait alors par une ligne de démarcation qui séparerait en quelque sorte une zone « moins fragilisée, voire plus dure » d'une zone « plus fragilisée, voire moins dure ».

IV - 2.2.3.3 Application de l'AFM à une étude de stabilité des microsphères de PLA avec L-158,809

L'AFM présente un avantage remarquable par rapport aux autres techniques de microscopie car elle a l'avantage de discriminer très précisément des structures fines à la surface des microsphères. C'est pourquoi, la possibilité de l'appliquer à des études de stabilité en explorant la surface des microsphères, rend cette technique de microscopie très appropriée.

Ainsi, l'AFM a permis de révéler précisément que des microsphères de PLA 95 248 PM avec PEG-1540 distéarate, contenant 20 % de L-158,809, placées en stabilité, dans des contenants de verre fermés, à la température ambiante de 25 °C, présentent, après une période de 15 mois, des cristaux de L-158,809 à leur surface (Figures IV-2.2-20). Il semble que dans ce cas précis il y ait eu une diffusion du principe actif au travers du polymère suivie de sa recristallisation à la surface de la particule.

L'analyse topographique par la phase confirme aussi remarquablement la présence de cristaux à la surface de ces microsphères comme le montre la Figure IV-2.2-21 .

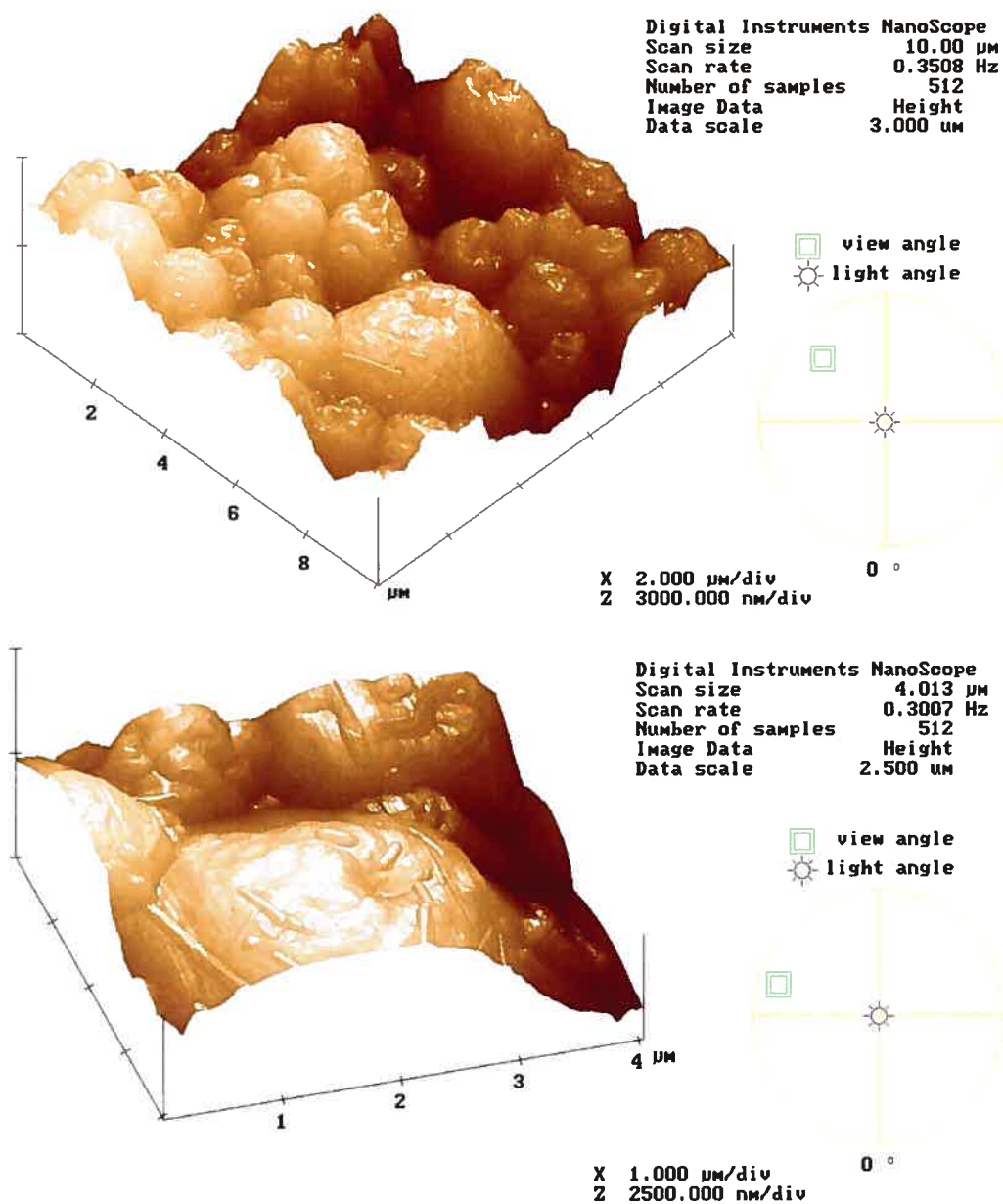


Figure IV - 2.2-20 Topographie par AFM de la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809 – Âge des microsphères : 15 mois – Présence de cristaux à la surface (Tailles de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns (en haut) et 4 microns (en bas)).

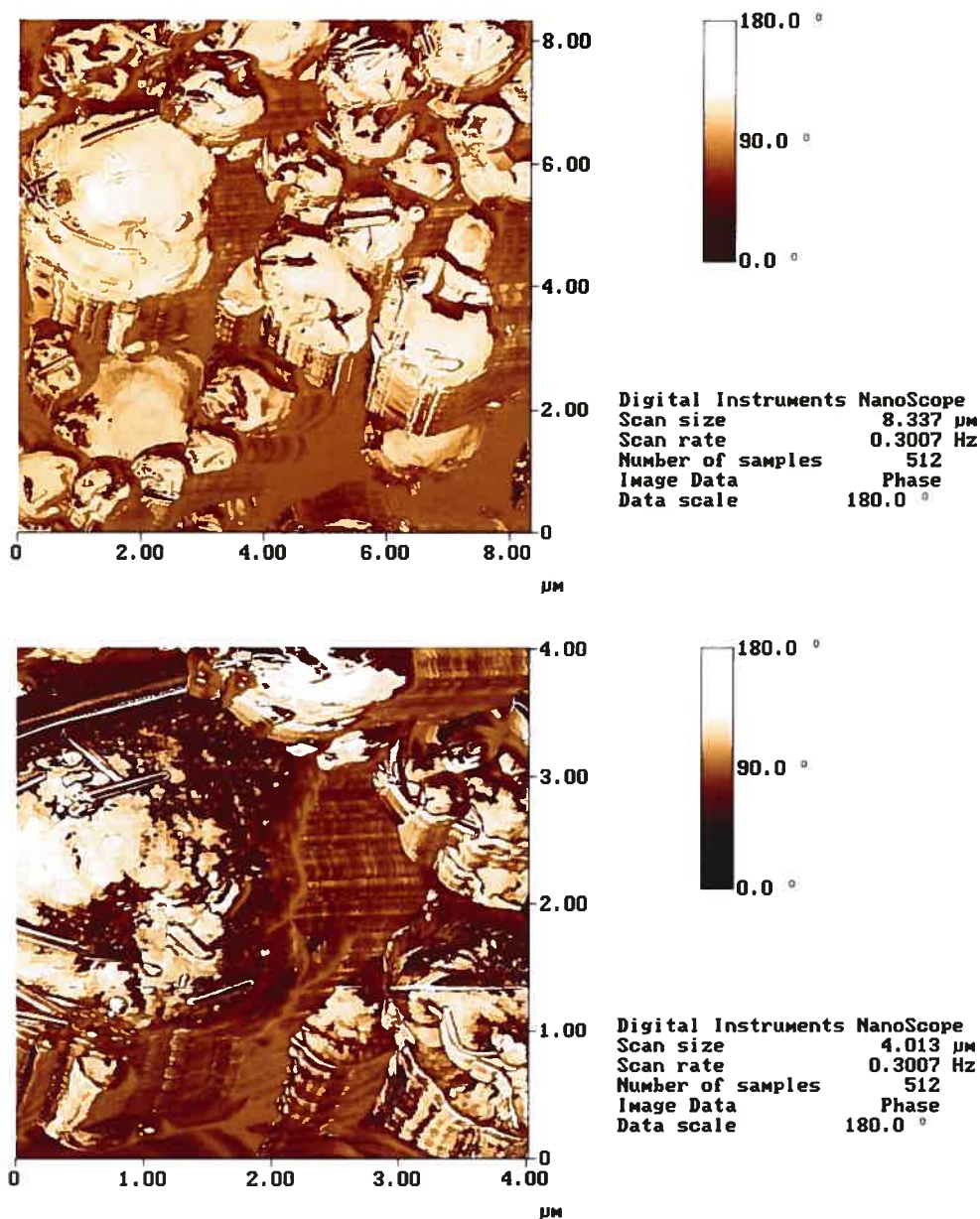


Figure IV - 2.2-21 Image de phase par AFM des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809 – Âge des microsphères : 15 mois à 25°C – Présence de cristaux à la surface (Tailles de surface de numérisation, *scan sizes* : 8 microns (en haut) et 4 microns (en bas)).

Par ailleurs, il semblerait que les cristaux débutent leur formation juste en dessous de la surface extérieure des microsphères et par leur croissance finissent par se retrouver à l'extérieur, comme semble le montrer la Figure IV-2.2-22. En effet, cette figure montre qu'il y a des craquelures de la surface de la microsphère (flèches rouge) au niveau du cristal en croissance. De plus, la flèche verte de la photographie du haut, qui tient compte des caractéristiques de hauteur et d'illumination, indique qu'il y a une distorsion de l'image d'un cristal lors de sa capture par AFM car il semble que ce cristal sondé soit positionné de biais ou presque à la verticale comme le confirme la photographie du bas, qui ne tient compte que des caractéristiques de hauteur. Il se pourrait que du fait de ce positionnement du cristal, la sonde (*tip*) par sa morphologie et sa géométrie structurale, n'ait rapporté que ce qu'elle a pu sonder par le mode *tapping*.

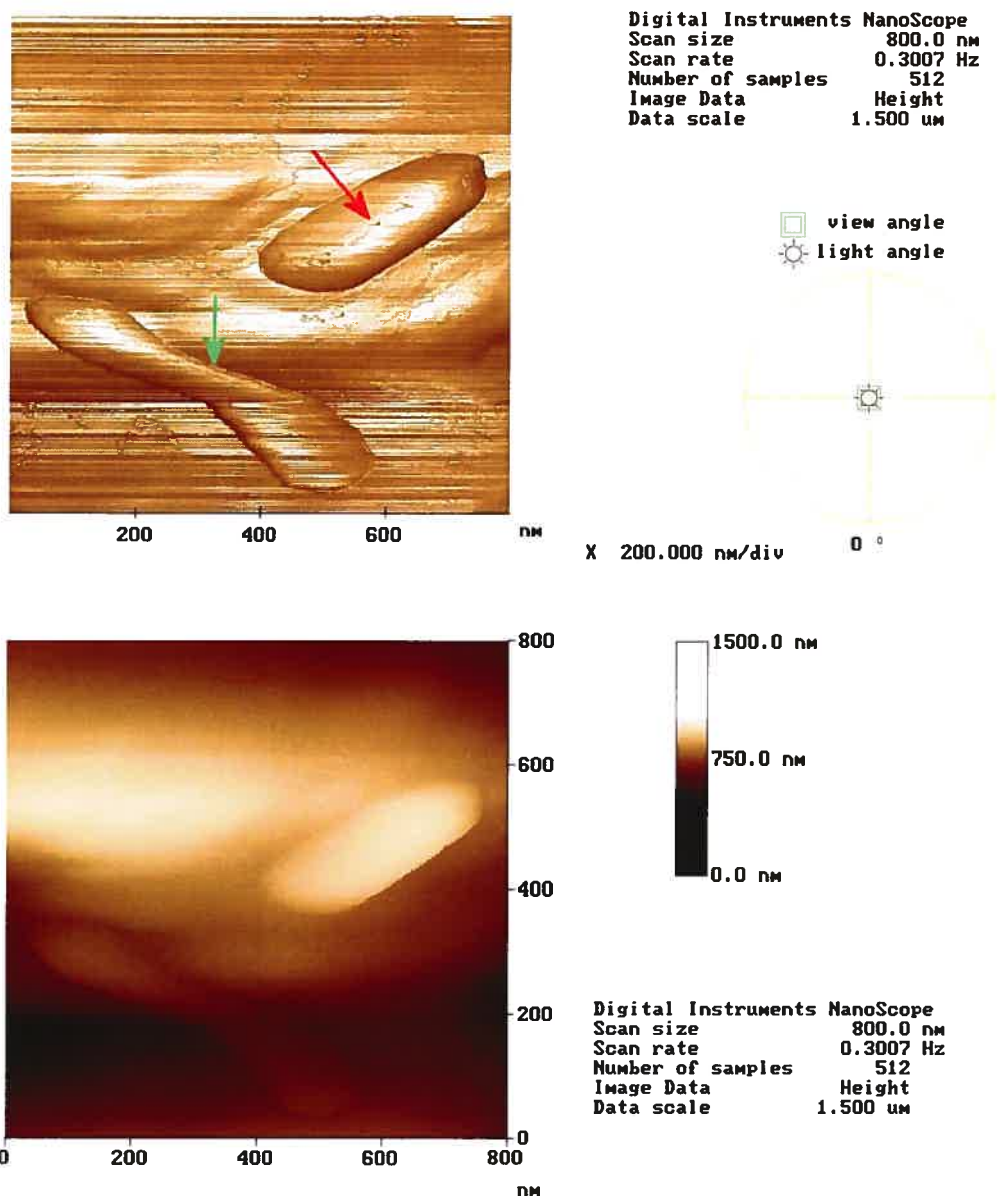


Figure IV - 2.2-22 Topographie par AFM des cristaux à la surface des microsphères nébulisées de PLA 95 248 PM avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809 – Âge des microsphères : 15 mois à 25°C – Caractéristiques considérées dans la photographie du haut : hauteur et illumination - Caractéristique considérée dans la photographie du bas : hauteur - (Taille de surface de numérisation, *scan size* : 800 nanomètres).

IV - 2.2.3.4 Analyse qualitative de la section par AFM des microsphères

Une analyse qualitative de la section des microsphères est également une excellente manière d'apprécier qualitativement leur morphologie, leur état de surface et leur diamètre.

Les Figures IV-2.2-23, IV-2.2-24 et IV-2.2-25 montrent des exemples d'analyse de section effectuée sur plusieurs microsphères nébulisées choisies. L'analyse de section permet de constater que leur surface semble lisse et leur morphologie, sphérique.

L'appréciation qualitative des analyses de sections montre que le diamètre des microsphères ne semble pas dépasser 4 μm comme l'illustrent les exemples des diamètres trouvées (*L ou horizontal distance (L)*) pour les microsphères évaluées suivantes :

- Celles de la Figure IV-2.2-23

Analyses du haut : 1,406 μm (rouge) ; 1,367 μm (vert) ; 1,230 μm (noir)

Analyses du bas : 2,344 μm (rouge) ; 3,652 μm (vert) ; 2,012 μm (noir)

- Celles de la Figure IV-2.2-24

Analyses du haut : 1,855 μm (rouge) ; 2,168 μm (vert) ; 2,031 μm (noir)

Analyses du bas : 2,188 μm (rouge) ; 2,336 μm (vert) ; 2,242 μm (noir)

- Celles de la Figure IV-2.2-25

Analyses : 800,78 μm (rouge) ; 1,551 μm (vert) ; 1,652 μm (noir)

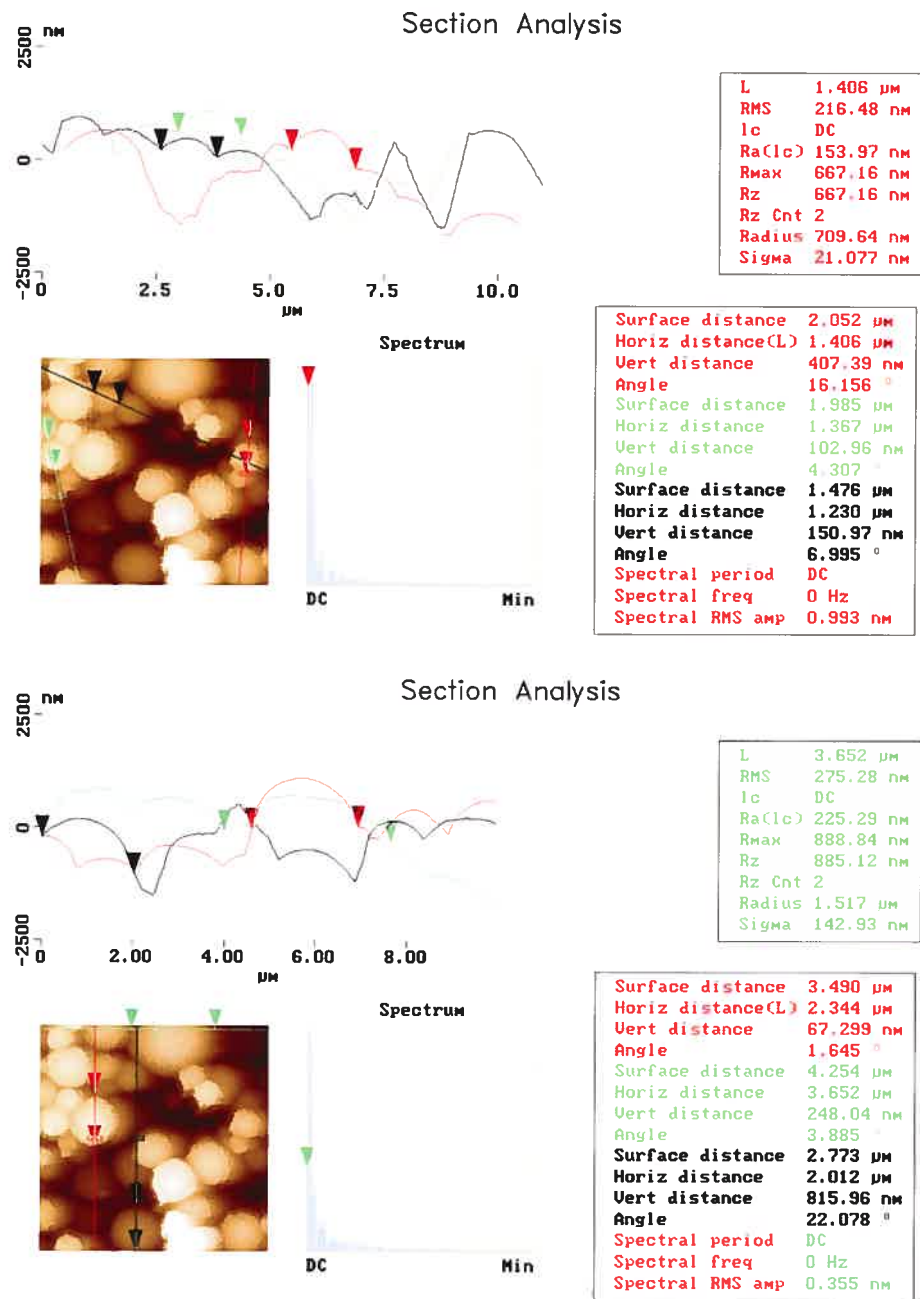


Figure IV - 2.2-23 Premier exemple d'analyse de section par AFM de microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM lcontenant 5 % de L-158,809 - (Taille de surface de numérisation, scan size : 10 microns).

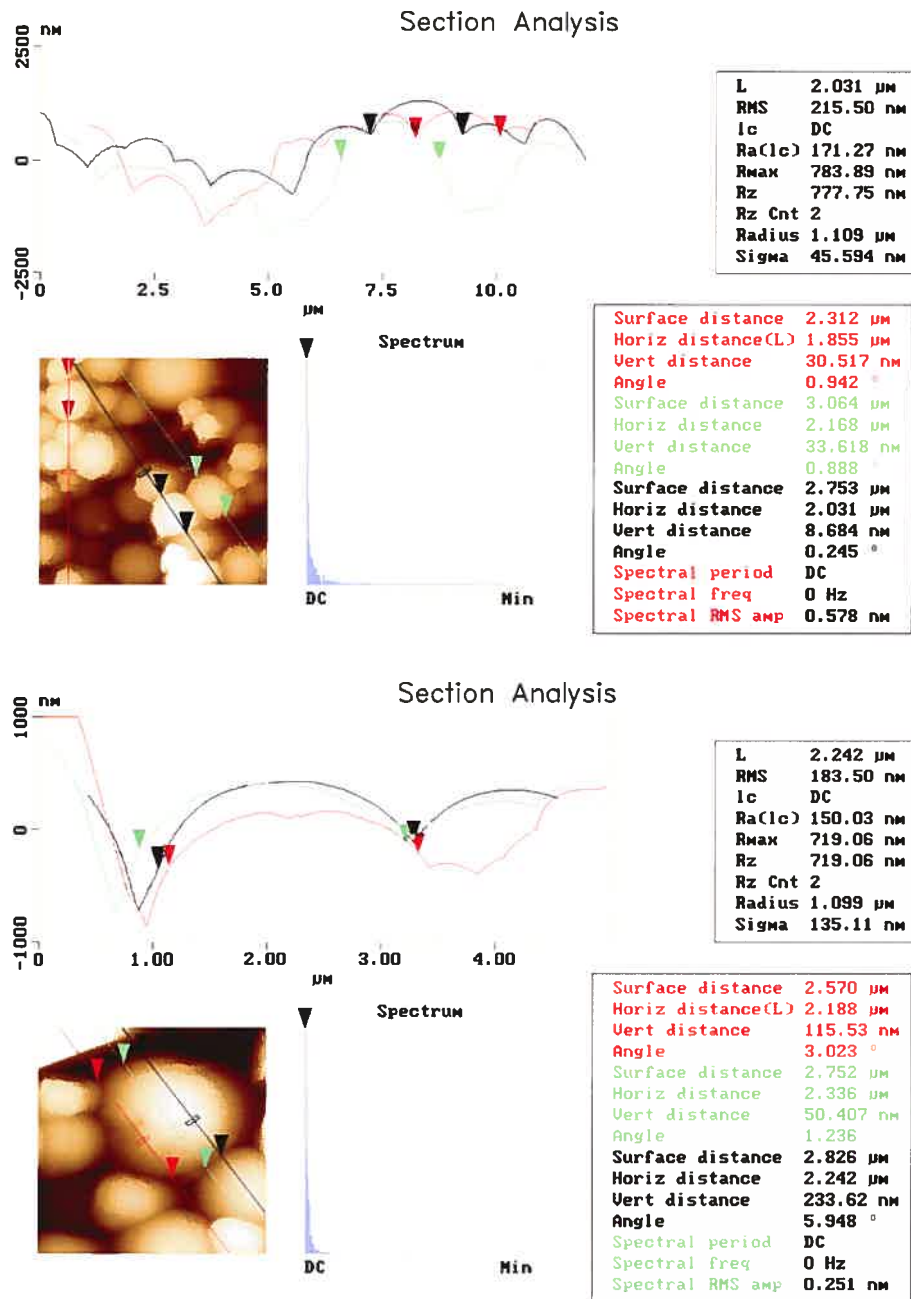


Figure IV - 2.2-24 Deuxième exemple d'analyse de section par AFM de microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM contenant 5 % de L-158,809 - (Tailles de surface de numérisation, *scan size* : 4 et 10 microns).

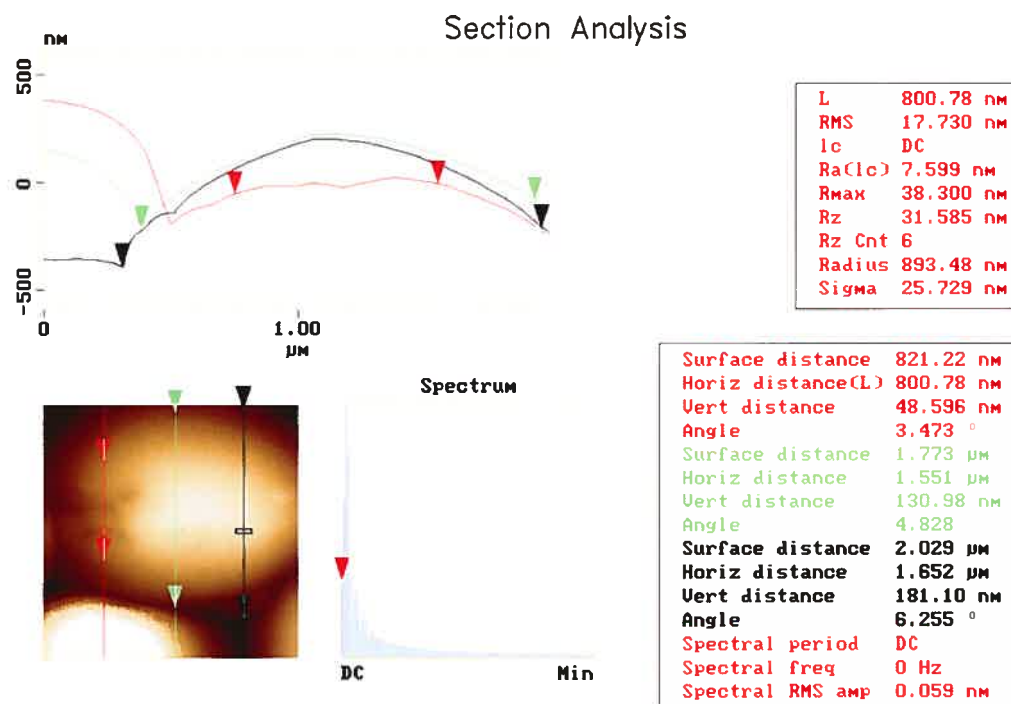


Figure IV - 2.2-25 Troisième exemple d'analyse de section par AFM de microsphère nébulisée de PLA 49 898 PM contenant 5 % de L-158,809 - (Tailles de surface de numérisation, *scan size* : 4 et 10 microns).

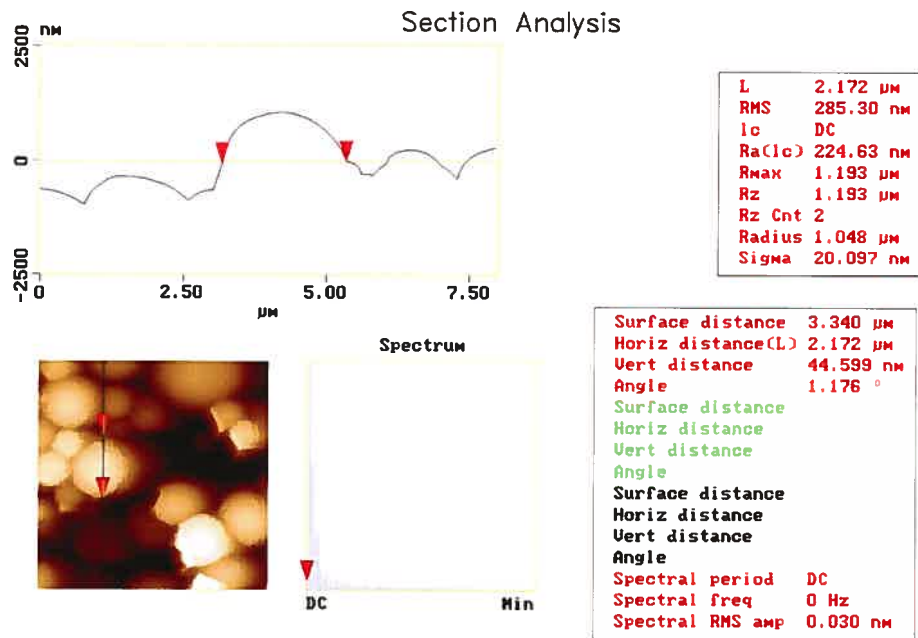
IV - 2.2.3.5 Application de l'AFM à l'évaluation de la complexité de surface des microsphères par analyse fractale selon la méthode surface-RMS

Les évaluations par AFM avaient précédemment montré que la surface des microsphères nébulisées semble lisse. Par ailleurs, comme il a été rapporté dans la revue de la littérature, la complexité d'une surface d'un objet peut être appréciée par une approche mathématique et complétée par une instrumentation appropriée. L'analyse fractale constitue cette approche mathématique, dont l'intérêt réside dans le fait qu'il est possible de remplacer un certain nombre de critères ou paramètres classiques par une notion unitaire qui est celle de dimension, dans le but d'évaluer la complexité d'une surface, autrement dit sa rugosité, par corrélation à un paramètre appelé *dimension fractale*. Le microscope à

force atomique est l'outil le plus approprié dans cette démarche compte tenu de ses caractéristiques instrumentales. Appliquer l'analyse fractale à une surface n'implique pas obligatoirement que cette surface soit fractale à toute échelle. En d'autres termes, le concept fractal peut aussi s'appliquer sur les surfaces réelles, dans un intervalle défini. C'est pourquoi, il a semblé intéressant d'utiliser l'analyse fractale pour déterminer l'état de rugosité de surface de différentes microsphères au moyen de l'AFM, qui permet de réaliser une analyse tridimensionnelle des surfaces. La méthode mathématique pour obtenir la dimension fractale de surface des microsphères a été la méthode Longueur – RMS (dans le cas d'un profil de courbe) ou plus précisément méthode Surface-RMS (dans le cas d'un profil de surface). Contrairement à Li et Park (1998), qui utilisaient l'AFM conjointement avec la méthode de variation, le fait d'accorder ici une importance au paramètre RMS permet de mieux tenir compte de toutes les caractéristiques de l'analyse tridimensionnelle de la surface effectuée par l'AFM, puisque ce microscope peut fournir le RMS à chaque taille (ou échelle) de surface d'un objet donné comme les microsphères.

Les Figures IV-2.2-26, IV-2.2-28 et IV-2.2-30 montrent des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809, à partir desquelles la dimension fractale de surface a été déterminée. Toutes ces microsphères, qui étaient issues d'un même lot de production (*batch*), montrent une morphologie équivalente, autrement dit une géométrie sphérique attestée par les analyses de section et les analyse des images topographiques AFM. Dans le cas de ces microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809, lorsqu'elles sont issues du même lot de production (*batch*) (Figures IV-2.2-26, IV-2.2-28 et IV-2.2-30), leur dimension fractale de surface ne semble pas varier de manière significative comme semblent vouloir le confirmer les Figures IV-2.2-27, IV-2.2-29 et IV-2.2-31.

Ainsi, dans cet exemple, les résultats des dimensions fractales de surface obtenues étaient : 2,016 (Figure IV-2.2-27) ; 2,041 (Figure IV-2.2-29) et 2,050 (Figure IV-2.2-31). La moyenne des trois valeurs était alors 2,035. L'écart type était 0,017. L'erreur type était 0,010 et le coefficient de variation (rapport écart type sur moyenne) était 0,0083 (autrement dit 0,83 %).



Roughness Analysis

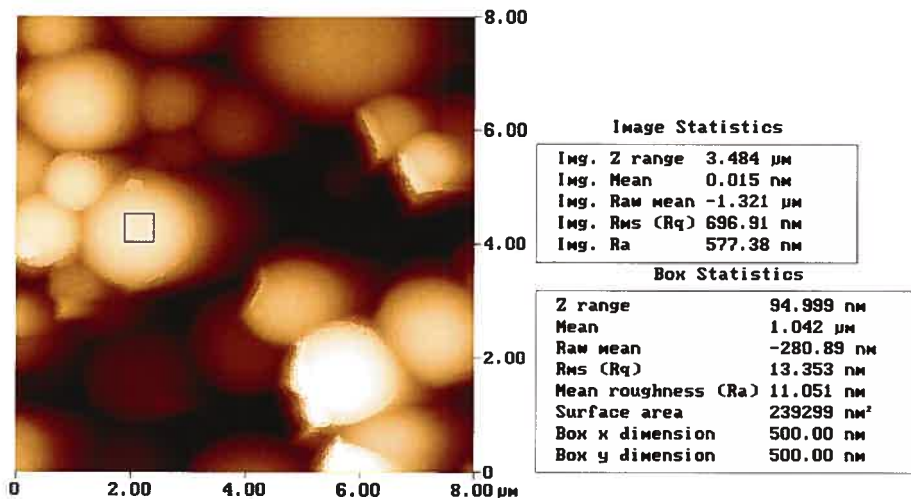
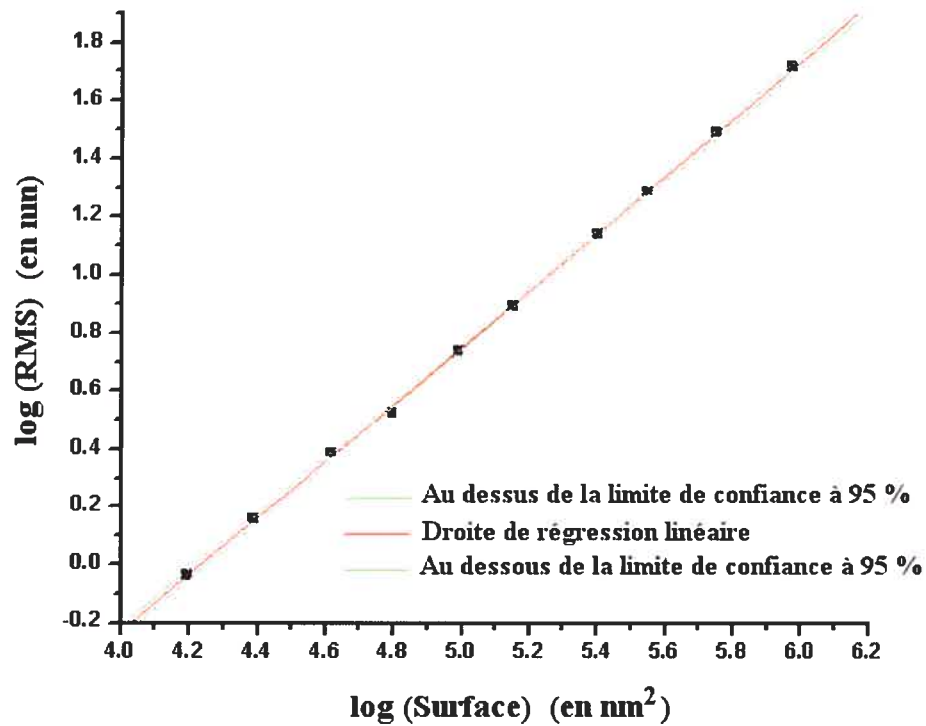
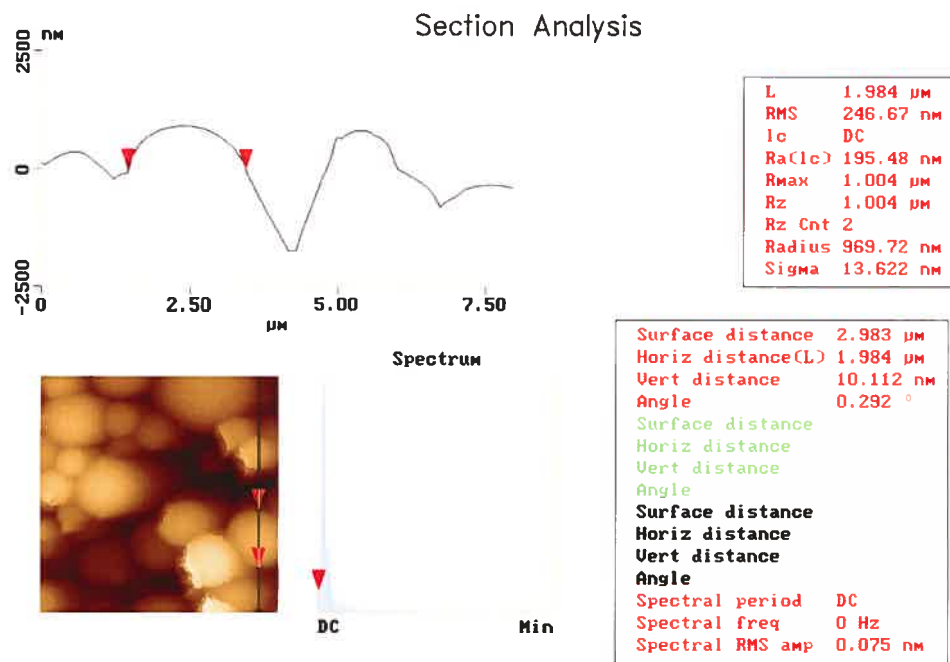


Figure IV - 2.2-26 Premier exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de la surface de numérisation, *scan size* : 8 microns.



Paramètre de la droite de régression linéaire : $Y = A + B \cdot X$		
Paramètre	Valeur	Erreur
A	-4.169	0.036
B	0.984	0.007
Effectif	N = 10	
Coefficient de corrélation	R = 0.999	
Déviation standard de la régression	SD = 0.013	
Probabilité (p-value) (que R soit nul) à un intervalle de confiance de 95 %	P < 0.0001	
Pente	B = 0.984	
Dimension fractale de surface (D = 3 - Pente)	D = 2.016	

Figure IV - 2.2-27 Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-26 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 15 625 nm² à 93 8476,6 nm² ($\approx 0,93 \mu\text{m}^2$). Chaque point est une moyenne de 10 données. Taille de la surface de numérisation totale, *scan size* : 8 microns.



Roughness Analysis

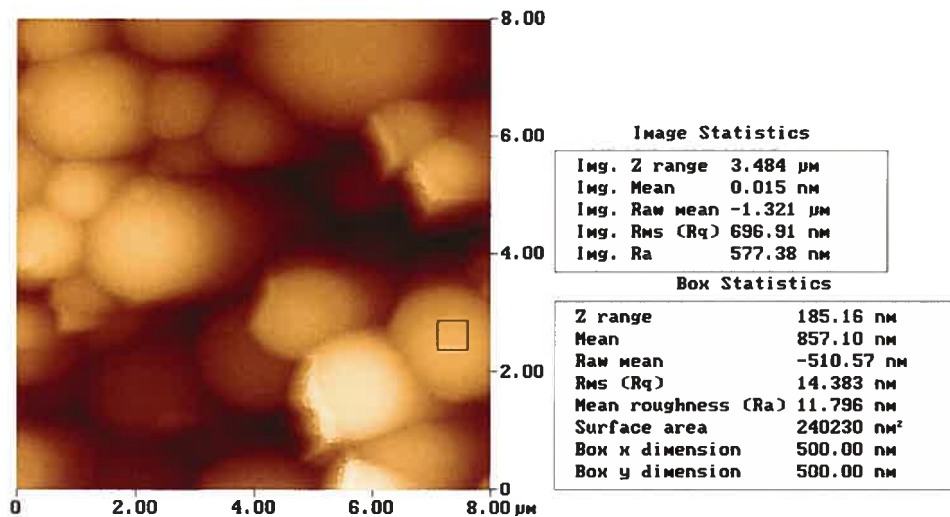
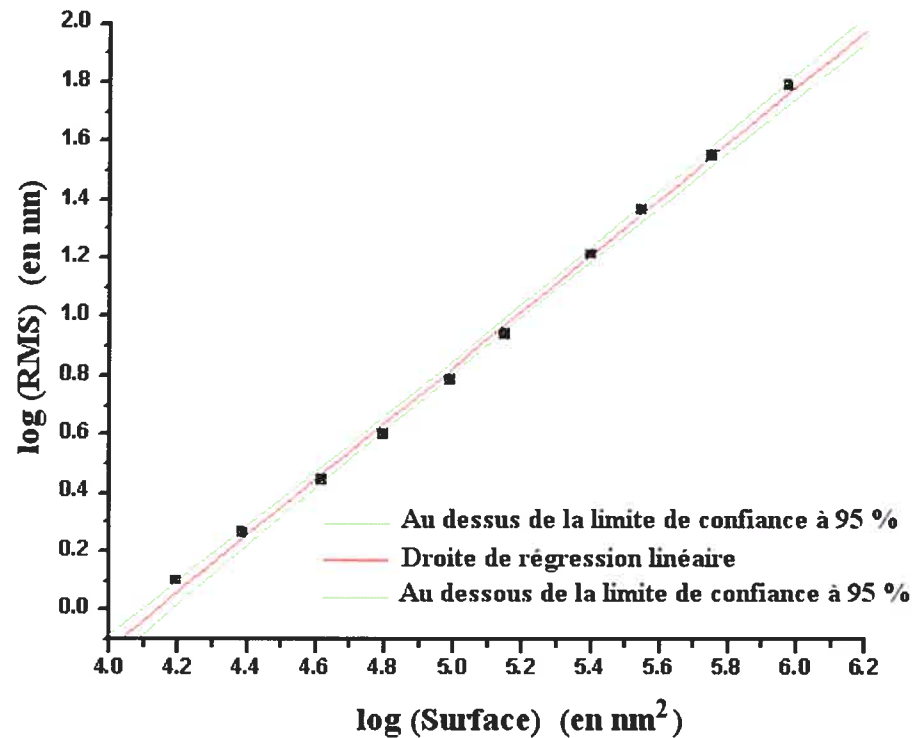


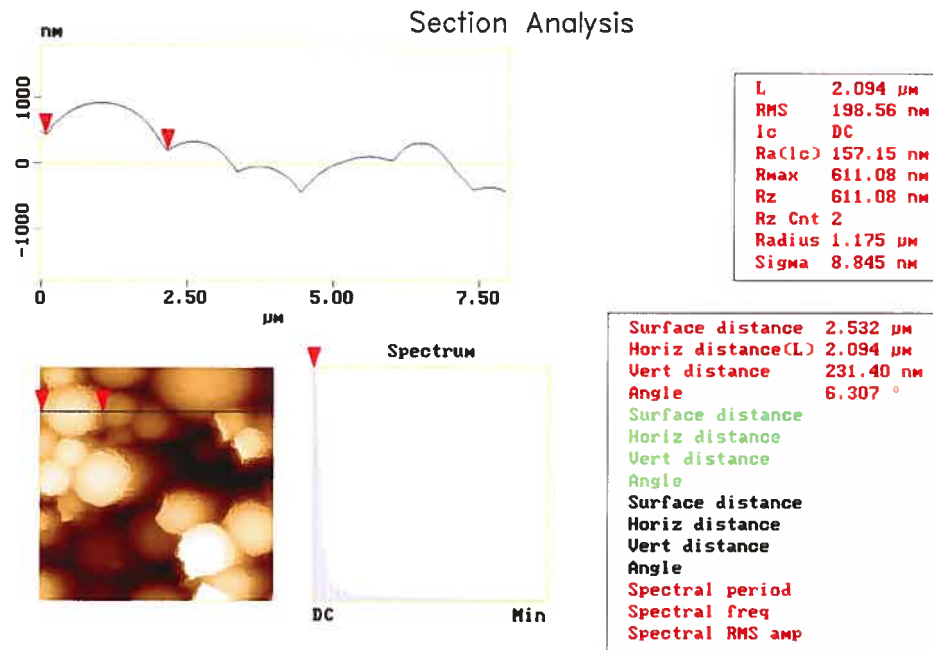
Figure IV - 2.2-28 Deuxième exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns.



Paramètre de la droite de régression linéaire : $Y = A + B \cdot X$

Paramètre	Valeur	Erreur
A	-3.966	0.085
B	0.959	0.016
Effectif	N = 10	
Coefficient de corrélation	R = 0.9988	
Déviatiion standard de la régression	SD = 0.029	
Probabilité (p-value) (que R soit nul) à un intervalle de confiance de 95 %	P < 0.0001	
Pente	B = 0.959	
Dimension fractale de surface (D = 3 - Pente)	D = 2.041	

Figure IV - 2.2-29 Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-28 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 15 625 nm² à 93 8476,6 nm² ($\approx 0,93 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, *scan size* : 8 microns.



Roughness Analysis

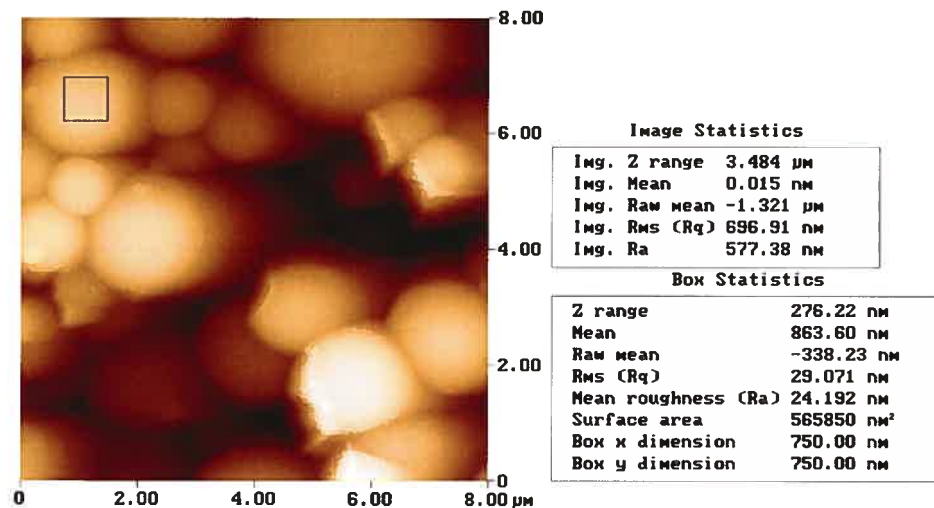
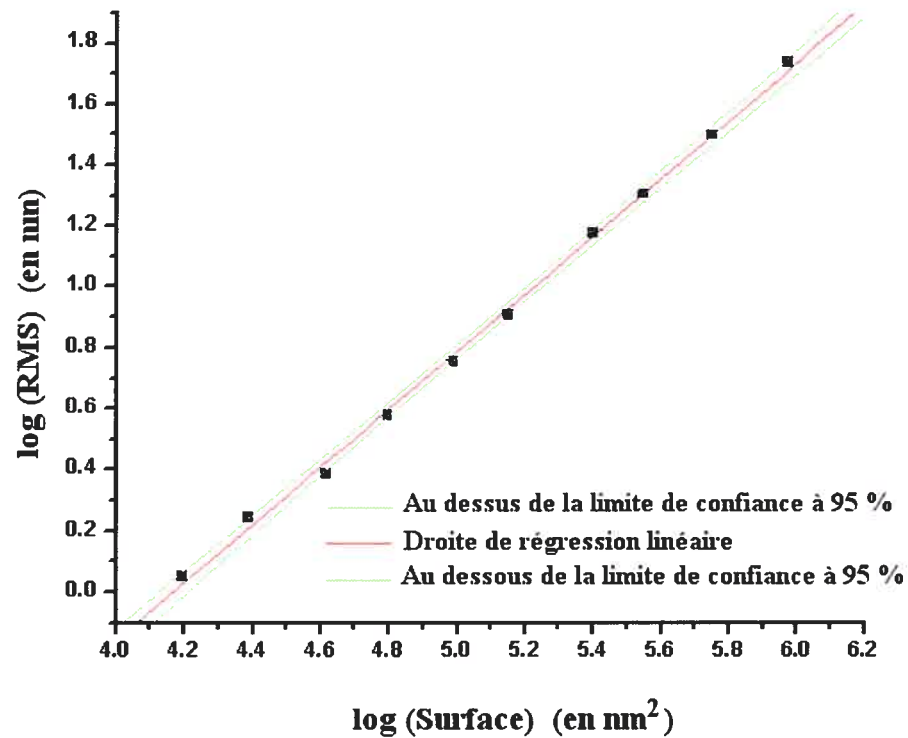


Figure IV - 2.2-30 Troisième exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale ; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns.



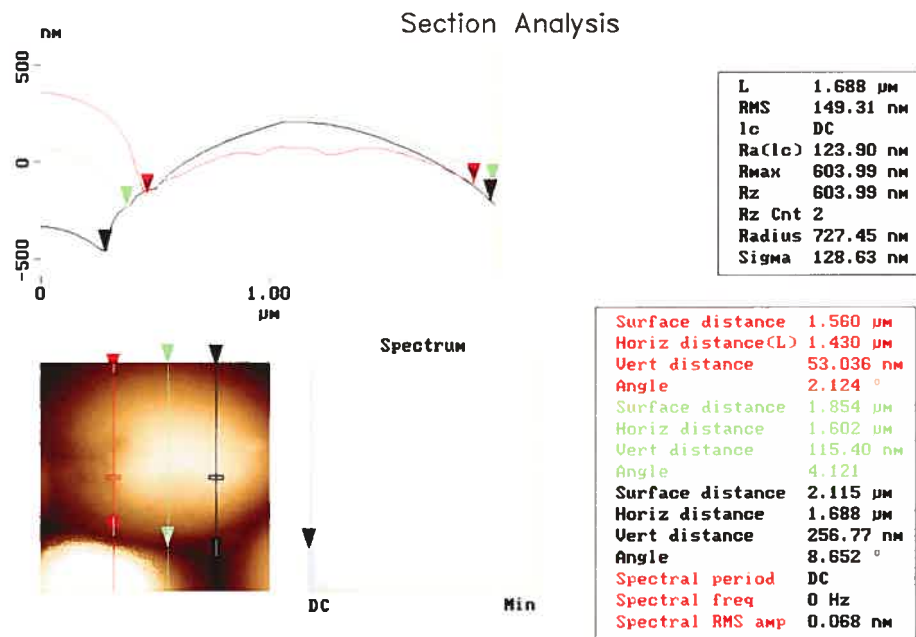
Paramètre de la droite de régression linéaire : $Y = A + B \cdot X$		
Paramètre	Valeur	Erreur
A	-3.961	0.081
B	0.95	0.016
Effectif	N = 10	
Coefficient de corrélation	R = 0.9988	
Déviation standard de la régression	SD = 0.028	
Probabilité (p-value) (que R soit nul) à un intervalle de confiance de 95 %	P < 0.0001	
Pente	B = 0.95	
Dimension fractale de surface (D = 3 - Pente)	D = 2.05	

Figure IV - 2.2-31 Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-30 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 15 625 nm² à 938 476,6 nm² ($\approx 0,93 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, scan size : 8 microns.

Ainsi, il semble que toutes les microsphères nébulisées d'un même lot de production présentent une rugosité de surface qui ne varierait pas significativement d'une microsphère à une autre puisque le coefficient de variation des trois mesures de dimension fractale de surface est inférieur à 5 %. Dès lors, la technique de microscopie à force atomique qui permet la détermination de la dimension fractale de surface des microsphères, au moyen de la relation surface-RMS, pourrait être alors une méthode appropriée pour contrôler la qualité d'une nébulisation par vérification de l'état de rugosité de surface des microsphères ainsi formées.

Dans la revue de la littérature, il a été mentionné l'existence de fractales avec des géométries qui possèdent la propriété d'auto-similarité (encore appelée *self-similarité*). Dans leur cas, c'est à dire pour l'auto-similarité, les différentes directions de l'espace sont équivalentes. Autrement dit, dans ce type de dilatation, c'est à dire d'auto-similarité, les figures sont agrandies ou réduites mais elles ne se déforment pas. Également, il existe une autre catégorie de fractales ayant une propriété d'invariance différente : c'est le cas des géométries auto-affines (encore appelée *self-affines*). Ces géométries sont invariantes lorsqu'une dilatation ou une réduction est opérée de façon différente selon les différentes directions de l'espace, par exemple une dilatation d'un facteur deux dans le sens horizontal et une dilatation d'un facteur trois dans le sens vertical. Il s'agit ainsi d'une transformation affine. En d'autres termes, dans une transformation affine, une figure se déforme, par exemple un carré se transforme en rectangle. Les géométries invariantes dans une telle transformation porte la caractéristique d'être auto-affines (ou *self-affines*).

Mais la fractalité auto-affine n'est pas aussi simple que la fractalité auto-similaire même s'il est possible de lui attribuer une dimension fractale. Ainsi, dans le cas de la topographie des microsphères, il est aisé de comprendre que toutes les directions de l'espace ne sont pas équivalentes. Comme l'axe vertical et les axes horizontales ne jouent plus le même rôle physique, il apparaît alors que la surface des microsphères n'est pas auto-similaire mais auto-affine. En d'autres termes, l'auto-affinité peut apparaître parce que précisément les différentes directions de l'espace y jouent un rôle différent, ce qui n'est bien sûr pas le cas pour l'auto-similarité.



Roughness Analysis

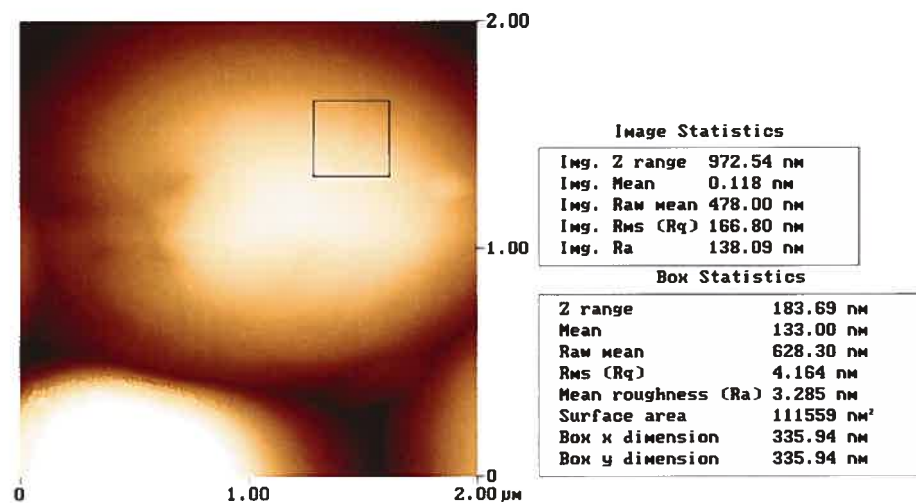
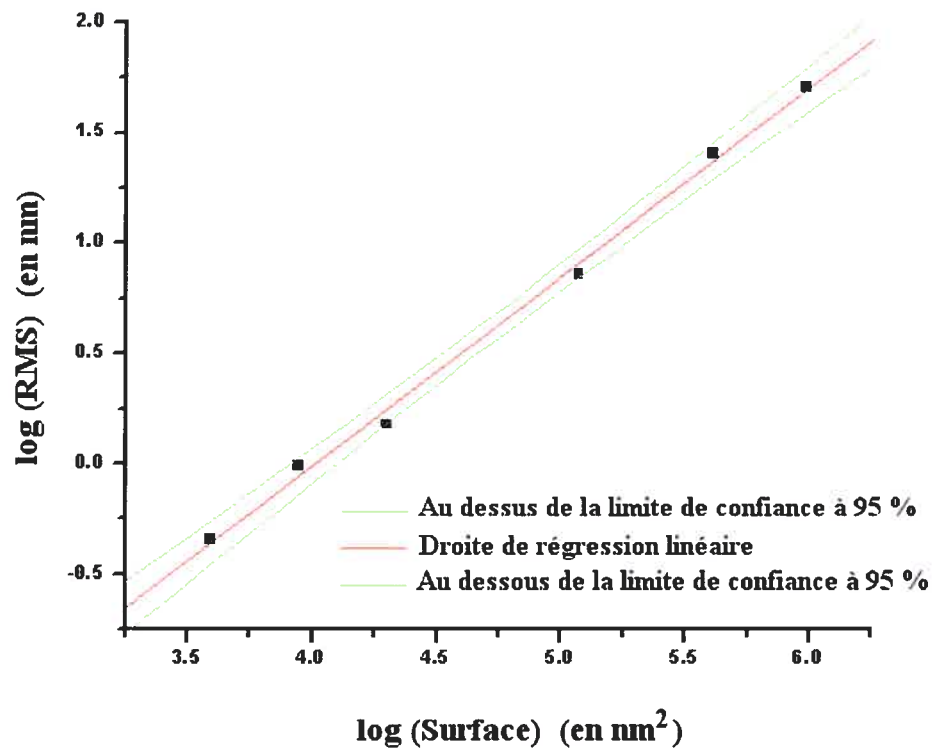
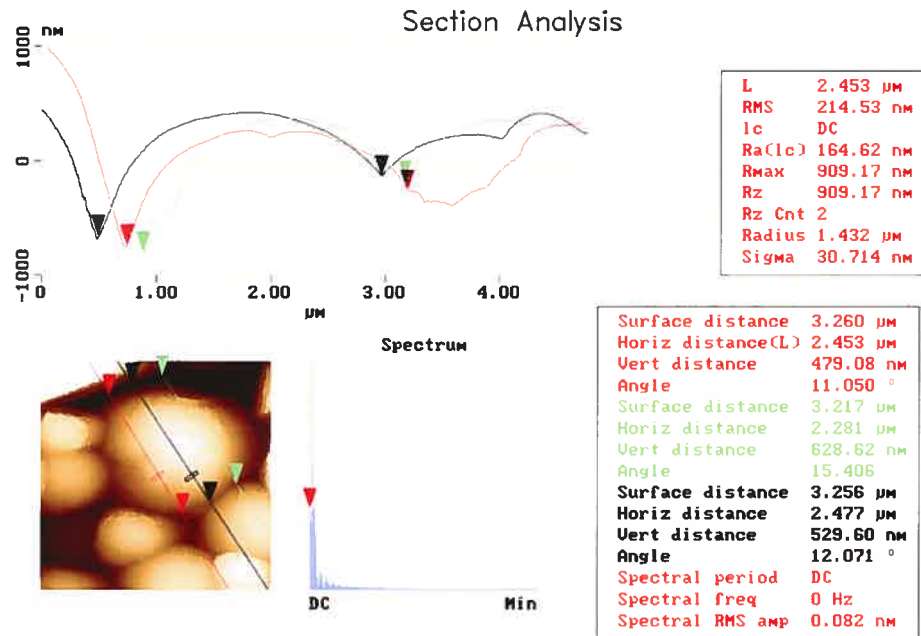


Figure IV - 2.2-32 Exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 2 microns.



Paramètre de la droite de régression linéaire : $Y = A + B \cdot X$		
Paramètre	Valeur	Erreur
<hr/>		
A	-3.439	0.119
B	0.857	0.024
<hr/>		
Effectif	N = 6	
Coefficient de corrélation	R = 0.998	
Déviatiion standard de la régression	SD = 0.052	
Probabilité (p-value) (que R soit nul) à un intervalle de confiance de 95 %	P < 0.0001	
Pente	B = 0.857	
Dimension fractale de surface (D = 3 - Pente)	D = 2.143	

Figure IV - 2.2-33 Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-32 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 3 906,25 nm² à 969 003,9 nm² ($\approx 0,96 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Surface de numérisation totale, *scan size* : 2 microns.



Roughness Analysis

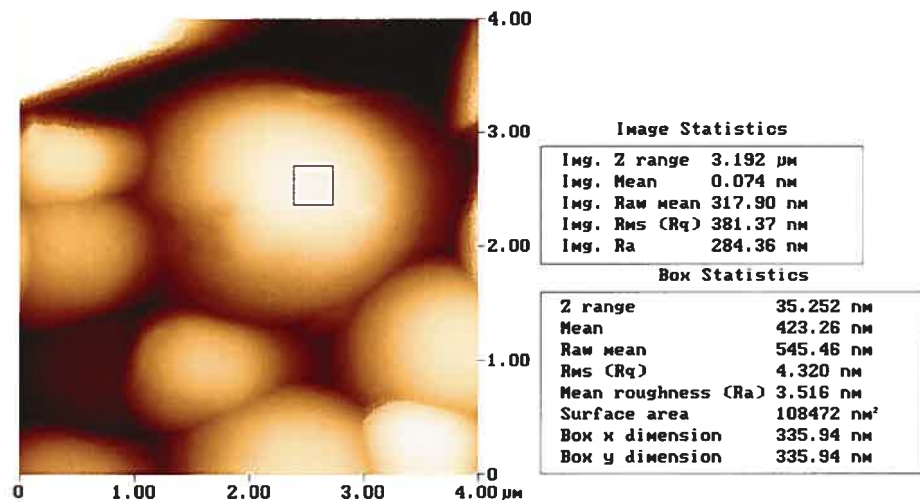
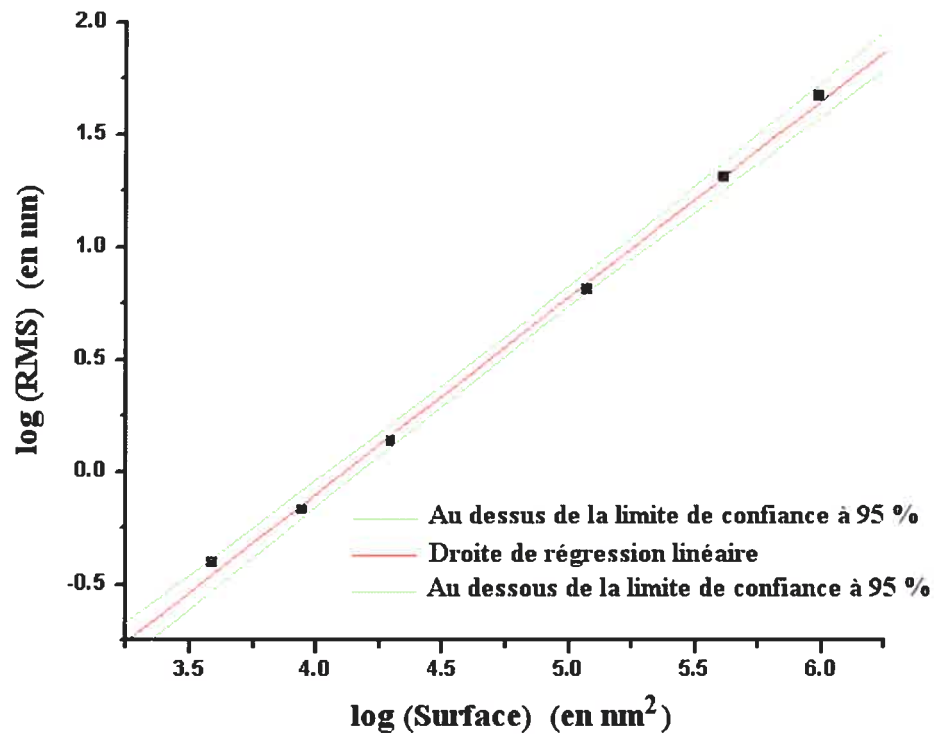
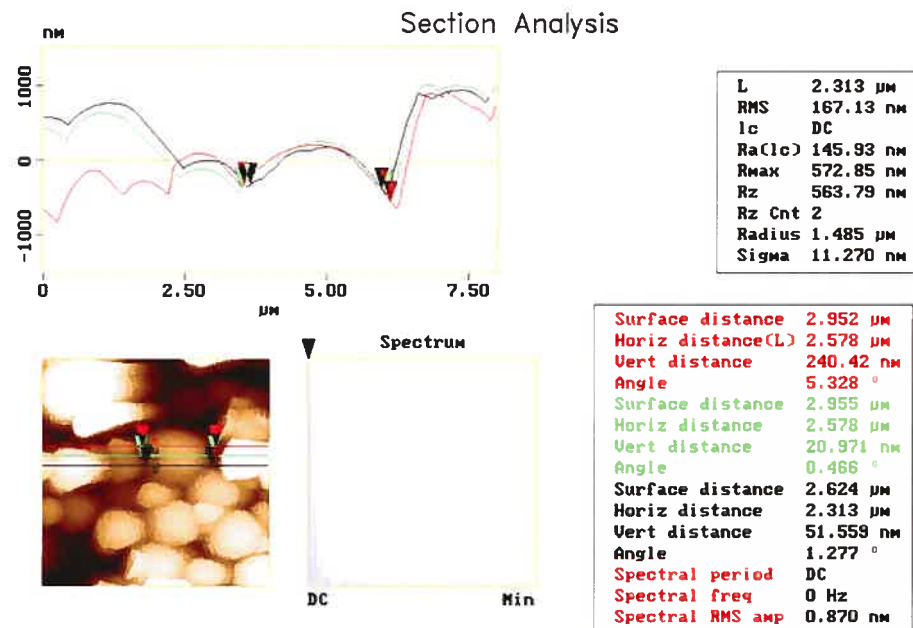


Figure IV - 2.2-34 Exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon des microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 4 microns.



Paramètre de la droite de régression linéaire : $Y = A + B \cdot X$		
Paramètre	Valeur	Erreur
A	-3.591	0.086
B	0.874	0.018
<hr/>		
Effectif	N = 6	
Coefficient de corrélation	R = 0.999	
Déviatiion standard de la régression	SD = 0.038	
Probabilité (p-value) (que R soit nul) à un intervalle de confiance de 95 %	P < 0.0001	
Pente	B = 0.874	
Dimension fractale de surface (D = 3 - Pente)	D = 2.126	

Figure IV - 2.2-35 Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-34 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 3 906,25 nm² à 969 003,9 nm² ($\approx 0,96 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, *scan size* : 4 microns.



Roughness Analysis

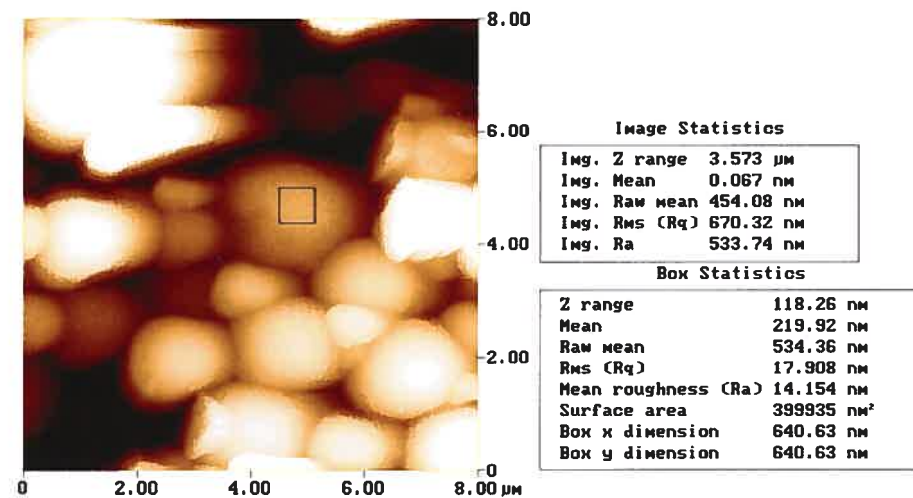
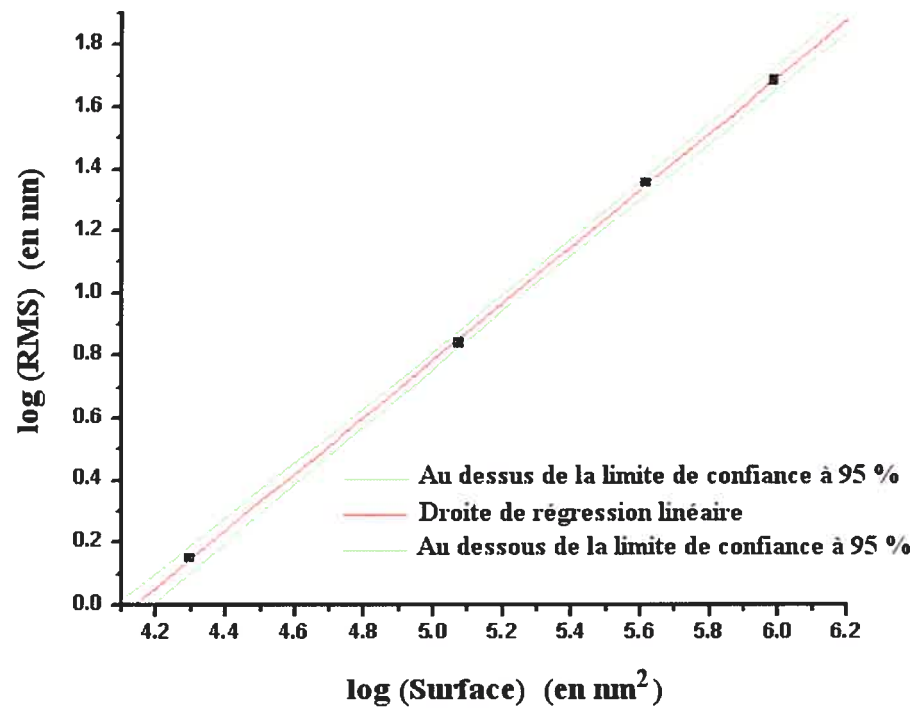


Figure IV - 2.2-36 Exemple d'image AFM de la microsphère choisie pour l'analyse fractale; Exemple d'une analyse de section et d'une obtention d'un RMS associé à une taille de surface. Échantillon de microsphères nébulisées de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns.



Paramètre de la droite de régression linéaire : $Y = A + B \cdot X$

Paramètre	Valeur	Erreur
A	-3.78	0.047
B	0.913	0.008

Effectif	N = 4
Coefficient de corrélation	R = 0.999
Déviation standard de la régression	SD = 0.011
Probabilité (p-value) (que R soit nul) à un intervalle de confiance de 95 %	P < 0.0001

Pente $B = 0.913$

Dimension fractale de surface $D = 2.087$
($D = 3 - \text{Pente}$)

Figure IV - 2.2-37 Détermination de la dimension fractale de surface de la microsphère de PLA 49 898 PM avec 5 % de L-158,809 de la Figure IV-2.2-36 et tracé du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm²) – Étendue de l'échelle de surface : de 19 776,8 nm² à 969 003,9 nm² ($\approx 0,96 \mu\text{m}^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation, *scan size* : 8 microns.

Les Figures IV-2.2-33, IV-2.2-35 et IV-2.2-37 permettent aisément de se convaincre que la surface des microsphères est fractale et donc réductible à une géométrie quantitative.

De plus, la considération attentive des dimensions fractales obtenues confirment le caractère auto-affine de la surface des microsphères.

En effet, pour une étendue d'échelle de surface définie :

- La Figure IV-2.2-33 montre une dimension fractale de surface égale à 2,143 obtenue à partir d'une taille de surface de numérisation de 2 microns.
- La Figure IV-2.2-35 montre une dimension fractale de surface égale à 2,126 obtenue à partir d'une taille de surface de numérisation de 4 microns.
- La Figure IV-2.2-37 montre une dimension fractale de surface égale à 2,087 obtenue à partir d'une taille de surface de numérisation de 8 microns.

De plus, il semble bien que la dimension fractale de surface diminue lorsque la taille de surface de numérisation augmente. Ce résultat est aussi bien corrélé avec les images topographique AFM de la surface de la microsphère choisie pour cette analyse :

- La Figure IV-2.2-32 montre une microsphère dont la taille de surface de numérisation est 2 microns.
- La Figure IV-2.2-34 montre une microsphère dont la taille de surface de numérisation est 4 microns.
- La Figure IV-2.2-36 montre une microsphère dont la taille de surface de numérisation est 8 microns.

Ainsi, plus la taille de surface de numérisation augmente, plus l'image AFM montre une topographie générale et éloignée de la surface de la microsphère et plus la dimension fractale de surface diminue, laissant apparaître une surface qui pourrait être qualifiée de « moins en moins rugueuse ». Par contre, plus la taille de surface de numérisation diminue, plus l'image AFM montre une topographie locale et proche de la surface de la microsphère et plus la dimension fractale de surface augmente, laissant apparaître une surface qui pourrait être qualifiée de « plus en plus rugueuse ».

Qu'en est-il exactement ?.

En fait, la réponse à cette question dépend de l'échelle (taille de surface de numérisation ou *scan size*) à laquelle l'analyse est considérée.

Alors que dans le cas d'une fractale auto-similaire, l'observation attentive montre toujours la même chose (c'est le cas par exemple du Brocoli Romanesco de la Figure IV-2.2-38), il n'en est pas de même de la fractale auto-affine. Ainsi, considérons un astronaute qui regarde la Terre depuis l'espace. Il voit une sphère. Plus il se rapproche de la Terre, plus il verra une surface irrégulière. En d'autres termes, dans le cas d'une fractale auto-affine, comme la surface des microsphères, il y a une taille au dessus de laquelle la surface apparaît presque plate et au dessous de laquelle elle apparaît avec des aspérités, formées de pics et de gouffres aigus. De cette illustration, il est alors possible de distinguer une dimension fractale globale, comme par exemple dans le cas de l'astronaute qui contemple la Terre depuis l'espace, puisque seul l'aspect global de la Terre sera apparent et une dimension fractale locale, comme par exemple le randonneur qui observe la surface du sol. Bien entendu, malgré le fait qu'il y ait une échelle particulière, les lois d'échelle continuent quand même d'exprimer une invariance géométrique puisque les images topographiques AFM de la microsphère des Figures IV-2.2-32, IV-2.2-34 et IV-2.2-36 sont toutes invariantes par dilatation, plus particulièrement par affinité, horizontale d'un facteur donné différent de celui de l'affinité verticale.

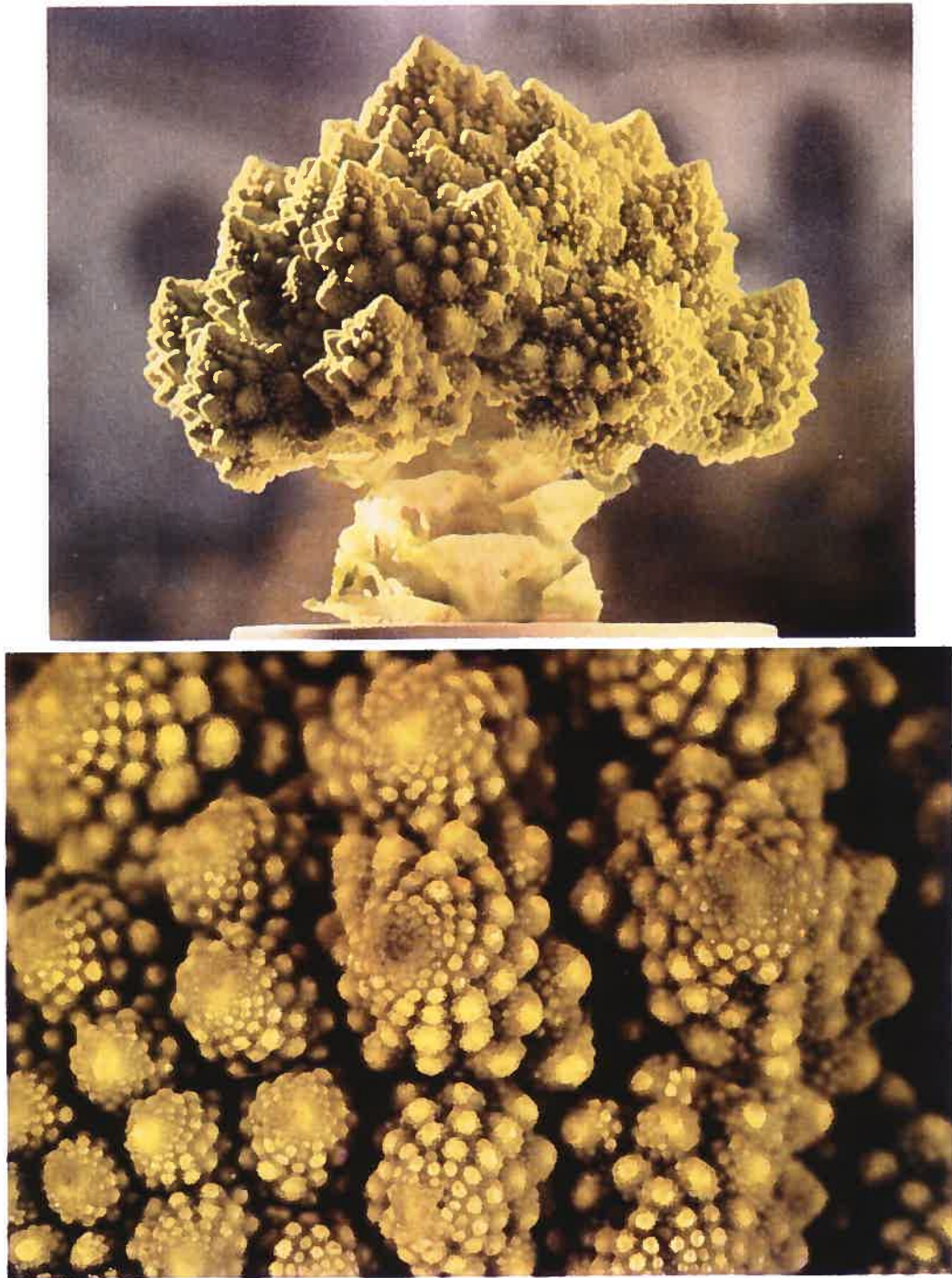


Figure IV - 2.2-38 Le Brocoli Romanesco. Un exemple d'auto-similarité à différentes échelles. (Tirée de Peitgen et coll., 1992)^[248].

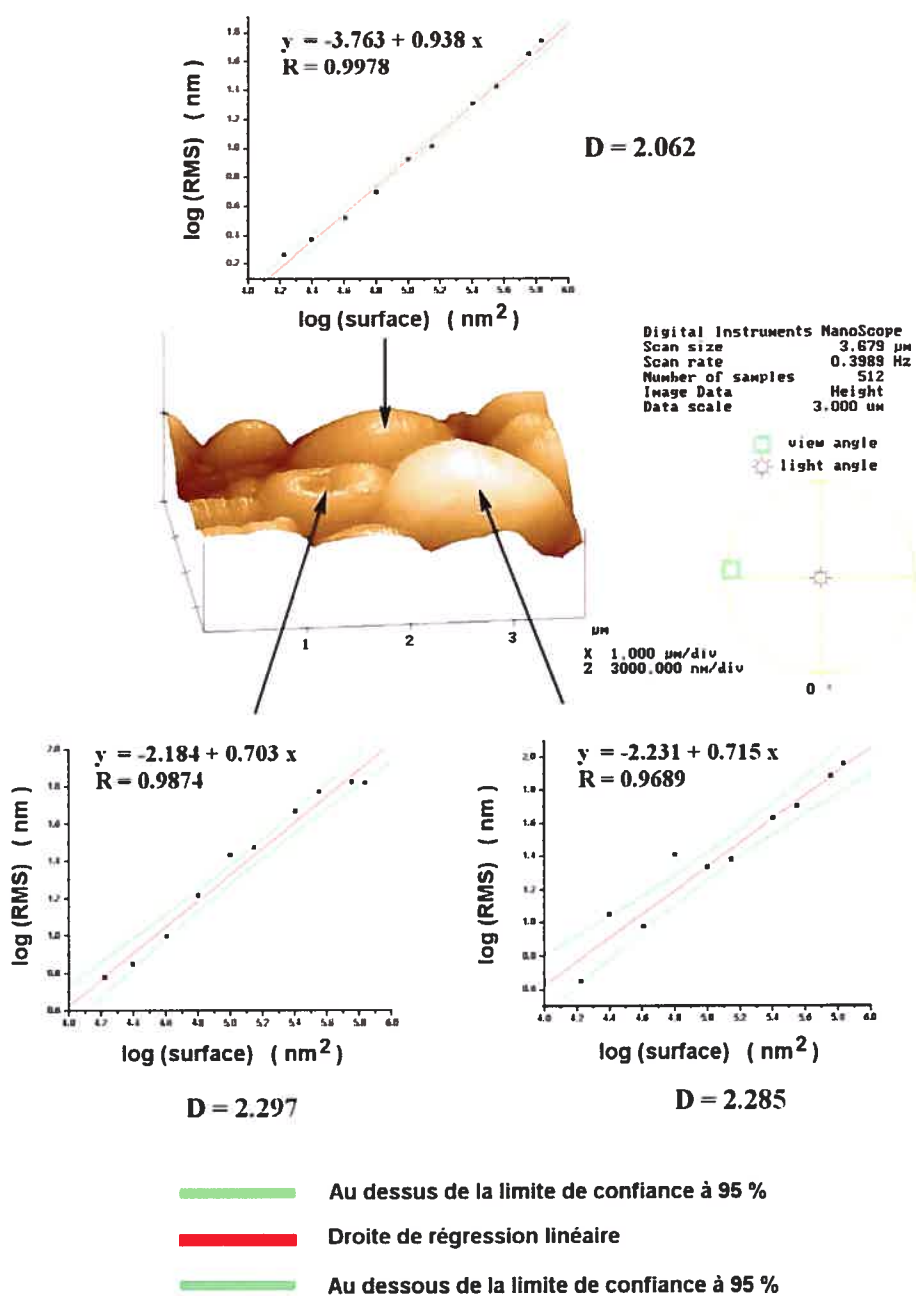


Figure IV - 2.2-39 Dimension fractale de surface de trois microsphères (de la même production) de PLA 95 248 PM avec PEG-1540 distéarate, contenant 20 % de L-158,809, ayant une surface avec ou sans collapse. Tracés du logarithme du RMS (en nm) en fonction du logarithme de la surface (en nm^2)- Étendue de l'échelle de surface : de 16 728,8 nm^2 à 682 854,3 nm^2 ($\approx 0,68 \mu m^2$). Chaque point est la moyenne de 10 données. Taille de surface de numérisation totale, *scan size* : 3,68 microns.

Bien qu'une augmentation de la dimension fractale de surface signifie une augmentation de la complexité de la surface étudiée, autrement dit une augmentation de l'état de la rugosité de la surface, il existe cependant des cas où cette augmentation est le reflet d'un phénomène sous-jacent.

La Figure IV-2.2-39 est un exemple de ce genre de situation. Ainsi, elle montre la détermination de la dimension fractale de surface de trois microsphères de PLA 95 248 PM, avec du PEG-1540 distéarate et 20 % de L-158,809. Bien que ces trois microsphères soient issues du même lot de production, elles diffèrent par l'absence ou la présence de collapse, plus ou moins marquées, à leur surface. Il est remarquable de constater que la dimension fractale de surface est $D = 2,062$ lorsque la surface est exempte de collapse mais qu'elle semble augmenter d'autant plus que la surface de la microsphère contient des collapses ($D = 2,297$ et $D = 2,285$) et que ces dernières sont plus profondes ($D = 2,297$). La présence de collapses à la surface des microsphères accroît la hauteur du profil de la surface de façon irrégulière ce qui influence la valeur du RMS avec pour conséquence une augmentation de la dimension fractale de surface de la microsphère. En d'autres termes, il est possible de considérer que la présence de collapses à la surface des microsphères soit une limitation à la méthode surface-RMS dans la détermination de la dimension fractale de surface, qui vise à évaluer l'état de rugosité de cette surface.

IV - 2.3 Analyses thermiques

Les analyses thermiques des microsphères sont effectuées à l'aide de deux techniques, l'analyse thermogravimétrique à haute résolution et l'analyse enthalpique différentielle.

IV - 2.3.1 Analyse thermogravimétrique à haute résolution

Les Figures IV – 2.3-1 et IV - 2.3-2 présentent respectivement les thermogrammes de TGA du polymère PLA (95 248 PM) et de l'excipient PEG-1540 distéarate. Elles indiquent aussi que la température de dégradation thermique maximale est 214,62°C dans le cas du PLA (95 248 PM) et 290,63°C dans le cas du PEG-1540 distéarate. De plus, la présence d'un seul palier de dégradation dans les deux figures, permet de dire que ces deux produits, qui sont utilisés dans plusieurs formulations de microsphères, perdent leur masse par dégradation thermique principalement en une étape, 98,87 % dans le cas du PLA et 95,05 % dans le cas du PEG-1540 distéarate. Le résultat final laisse moins de 5 % de résidus, 1,13 % de résidus pour le PLA et 4,95 % de résidus pour le PEG-1540 distéarate, même lorsque la température atteint 450 °C.

Les Figure IV – 2.3-3 et Figure IV – 2.3-4 présentent respectivement les thermogrammes de TGA de deux modèles de principe actif, le Captopril et le L-158,809.

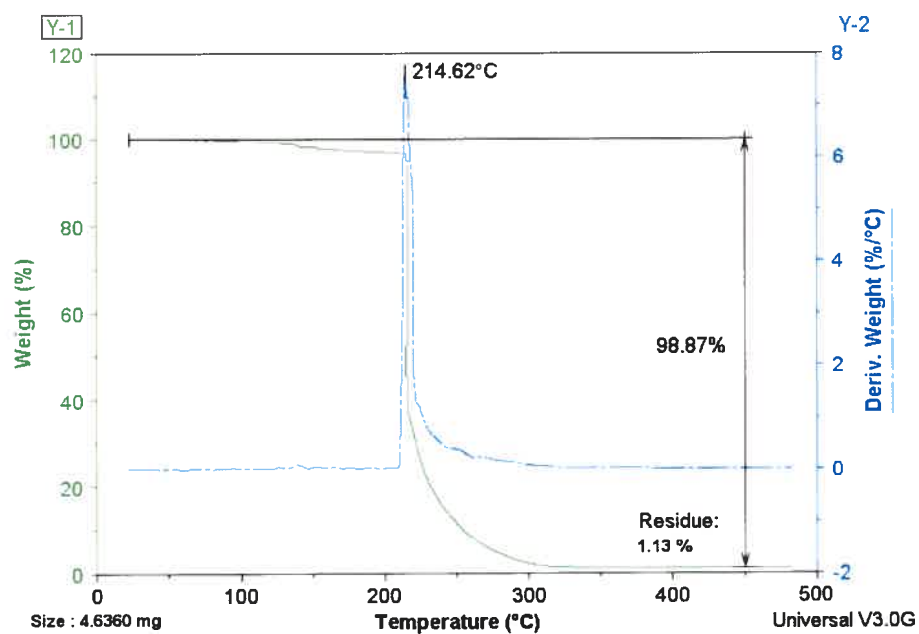


Figure IV - 2.3-1 Thermogramme de TGA du PLA (95 248 PM).

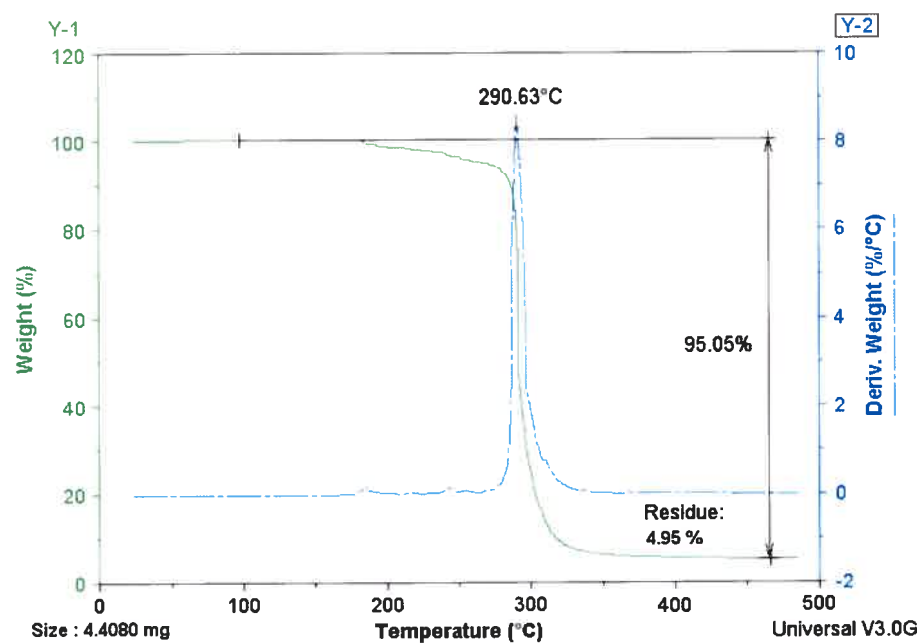


Figure IV - 2.3-2 Thermogramme de TGA du PEG-1540 distéarate.

La Figure IV – 2.3-3 montre que la température de dégradation thermique maximale du Captopril est 125,54 °C. De plus, la présence d'un seul palier de dégradation dans le thermogramme de TGA du Captopril, permet de dire que 95,69 % du médicament subit une dégradation thermique en une étape et laisse moins de 5 % de résidus (4,303 % de résidu), même lorsque la température atteint 800 °C. Comme l'expérience a été réalisée sous une atmosphère d'azote et non d'oxygène, les résidus de Captopril devraient être des résidus de carbone, essentiellement et de soufre.

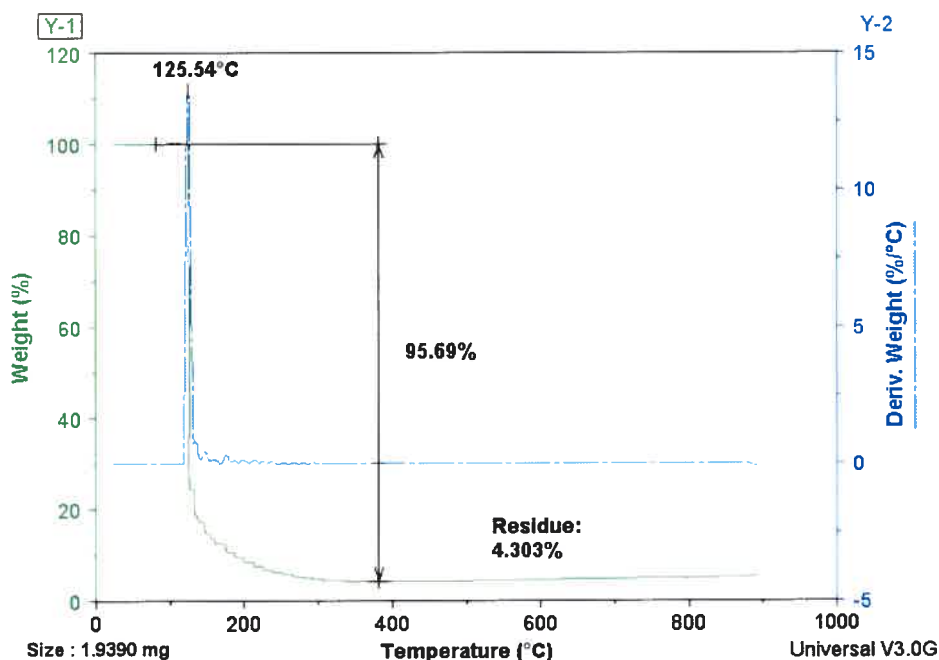


Figure IV - 2.3-3 Thermogramme de TGA du Captopril.

Par contre, la Figure IV – 2.3-4 illustre une toute autre situation. En effet, le L-158,809 semble se dégrader thermiquement en deux étapes majeures. Le premier palier, qui représente 20,44 % de la masse de départ, possède une température de dégradation

thermique maximale à 214,54 °C. Le second palier, qui représente 62,95 % de la masse de départ, possède une température de dégradation thermique maximale à 295,25 °C.

À 800 °C, le pourcentage de résidus restant est 16,61 % dans le cas du L-158,809. Le L-158,809 est sous forme d'un sel de potassium. Comme précédemment, l'expérience a été réalisée sous une atmosphère d'azote et non d'oxygène, les résidus de L-158,809 devraient être alors des résidus de carbone, en majorité, et des résidus de potassium.

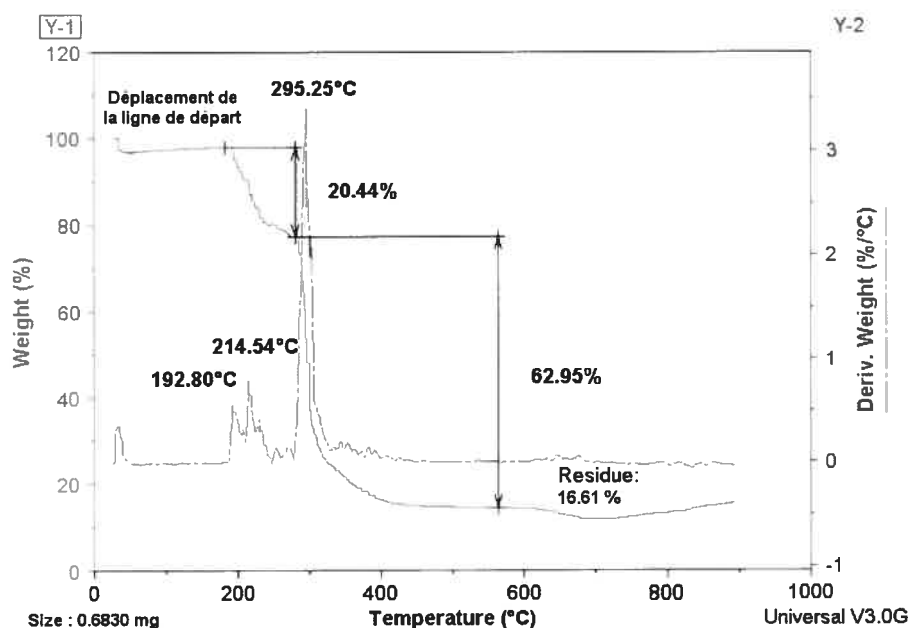


Figure IV - 2.3-4 Thermogramme de TGA du L-158,809.

Avant l'analyse des échantillons de microsphères contenant le Captopril ou le L-158,809, une évaluation thermogravimétrique de microsphères dépourvues de médicaments est une étape obligée. La Figure IV - 2.3-5 représente le thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM) seules. Cette figure indique que la température de dégradation thermique maximale des microsphères de PLA (95 248 PM) est 218,55 °C. Le fait que cette température s'écarte de 1,8 % de celle constatée dans la Figure IV - 2.3-1

(214,62 °C) laisse à penser que le processus de nébulisation du PLA (95 248 PM) ne semble pas affecter grandement la température de dégradation thermique maximale du polymère PLA. Par contre, il est intéressant de souligner que la nébulisation semble améliorer l'unique étape de dégradation thermique, puisque à 218,55 °C des microsphères de PLA se dégradent en une proportion un peu plus grande, c'est à dire 99,46 %, comparativement à celle du polymère de PLA à l'état brut, qui représente 98,87 %. Il s'agit donc d'une amélioration de la dégradation thermique de 0,6 % par rapport au produit brut.

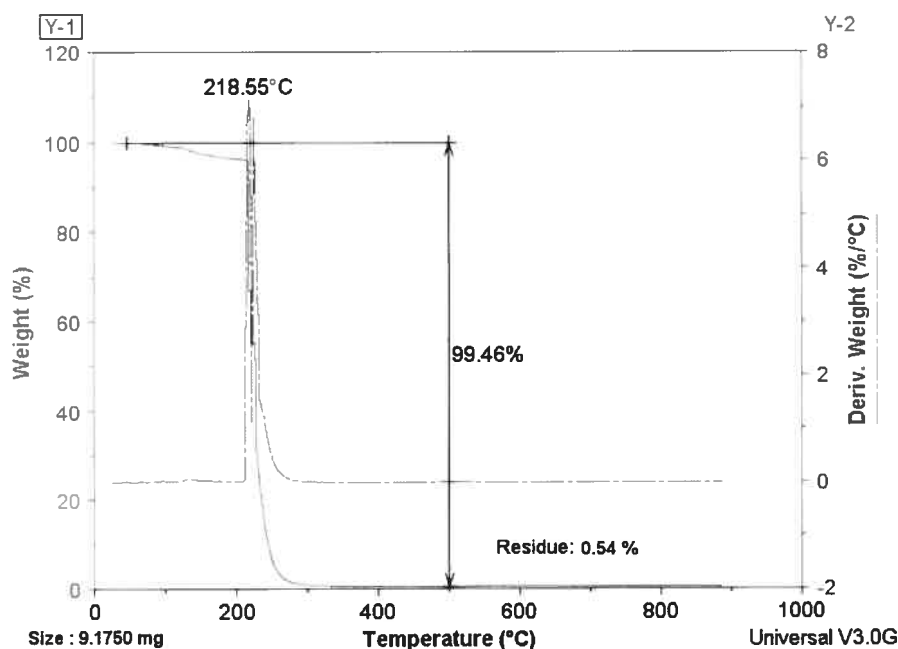


Figure IV - 2.3-5 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM) seules.

Lors du processus de nébulisation, les chaînes de polymère s'orientent et permettent à ce dernier d'adopter une forme spatiale stable, que représente la microsphère. Le passage à l'état de microsphère contribue alors à augmenter la surface active du polymère. Ainsi, la microsphère polymérique offrirait alors une surface plus grande, susceptible d'être attaquée

ou dégradée. C'est pourquoi, une élévation croissante de température, au-delà de la température de dégradation thermique maximale du polymère, dégraderait plus facilement l'ensemble du produit lorsque ce dernier est sous forme de microsphère que s'il était sous forme brute.

La Figure IV – 2.3-6 représente le thermogramme de TGA de microsphères composées de PLA (95 248 PM) (89 %) et de PEG-1540 distéarate (11 %). Cette figure indique qu'il y a deux paliers de dégradation, ayant chacun une température de dégradation thermique maximale. Le premier palier représente 86,71 % de la masse de départ, avec une température de dégradation thermique maximale de 214,91 °C. Le second palier représente 10,84 % de la masse de départ avec une température de dégradation thermique maximale de 308,65 °C. Le pourcentage de résidus est inférieur à 1 %, à partir de 400 °C.

Comme les microsphères analysées ne contiennent que deux composants, dont la proportion est connue (89 % de PLA et 11 % de PEG-1540 distéarate), établir alors une relation entre l'existence des deux paliers de dégradation avec la présence du PLA (95 248 PM) et du PEG-1540 distéarate au sein des microsphères, devient possible. Cette thèse est d'autant plus étayée par le fait des proportions. En effet, le premier palier, qui représente 86,71 % de la masse de départ, est à corrélérer avec la présence théorique de 89 % de PLA (95 248 PM). Le second palier, qui représente 10,84 % de la masse de départ, est à corrélérer avec la présence théorique de 11 % de PEG-1540 distéarate. Enfin, il semble aussi y avoir une bonne relation dans le cas des températures de dégradation thermique maximale puisque selon les Figures IV – 2.3-1 et IV – 2.3-5, le PLA se dégrade respectivement à 214,62 °C (forme brute) et 218,55 °C (microsphère) et selon la Figure IV – 2.3-2, le PEG-1450 distéarate se dégrade à 290,63 °C. Ces constatations permettent alors d'explorer, par l'analyse thermogravimétrique à haute résolution, des microsphères composées maintenant de trois constituants.

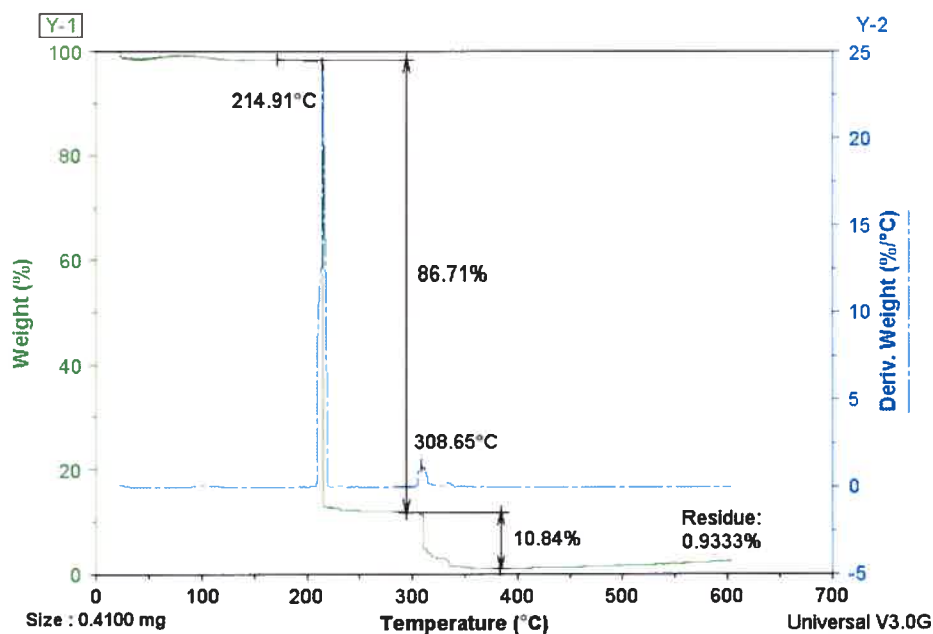


Figure IV - 2.3-6 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM) (89 %) et PEG-1540 distéarate (11 %).

Les Figures IV – 2.3-7, IV – 2.3-8, IV – 2.3-9 et IV – 2.3-10 représentent les thermogrammes de TGA des microsphères composées de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril selon les teneurs respectives 10 %, 20 %, 30 % et 40 %.

Les données de ces figures sont aussi reprises dans le Tableau IV – 2.3-1 qui fournit un résumé des résultats des thermogrammes de TGA des microsphères composées de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et de Captopril (aux teneurs 10 %, 20 %, 30 % et 40 %).

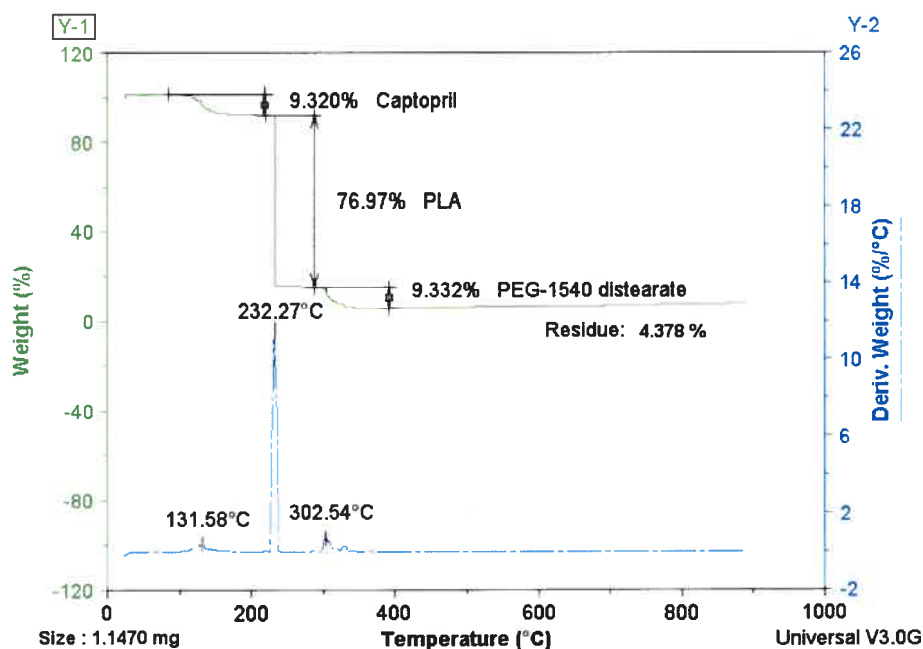


Figure IV - 2.3-7 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 10 %

Elles semblent indiquer une bonne corrélation entre les paliers de dégradation thermique, exprimés en pourcentage, et les proportions théoriques des produits qui composent les microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate, lorsque le principe actif est le Captopril. De plus, il semble aussi en être de même pour les températures de dégradation thermique maximales. C'est pourquoi, le premier palier serait alors la visualisation de la dégradation thermique du Captopril, le second serait celui du PLA (95 248 PM) et enfin le troisième palier serait celui du PEG-1540 distéarate.

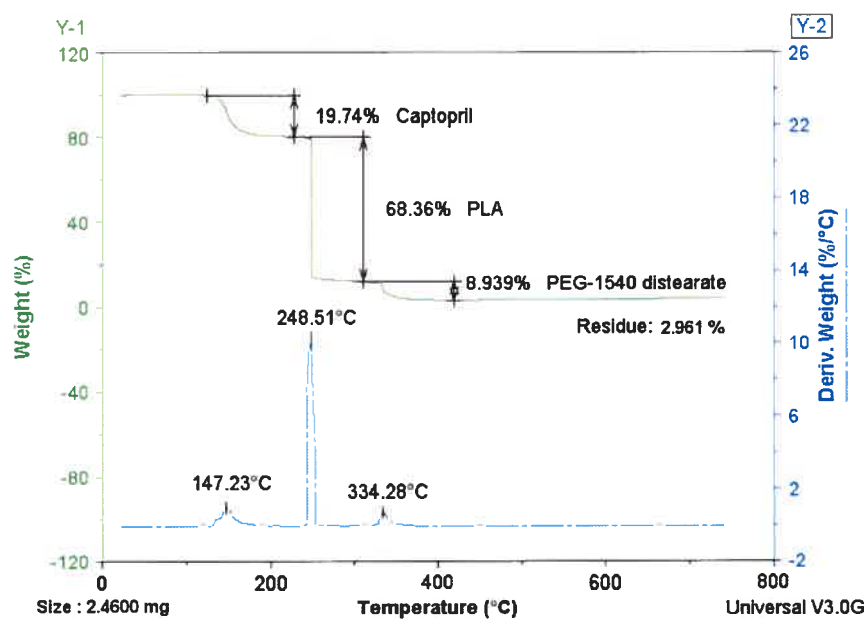


Figure IV - 2.3-8 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 20 %

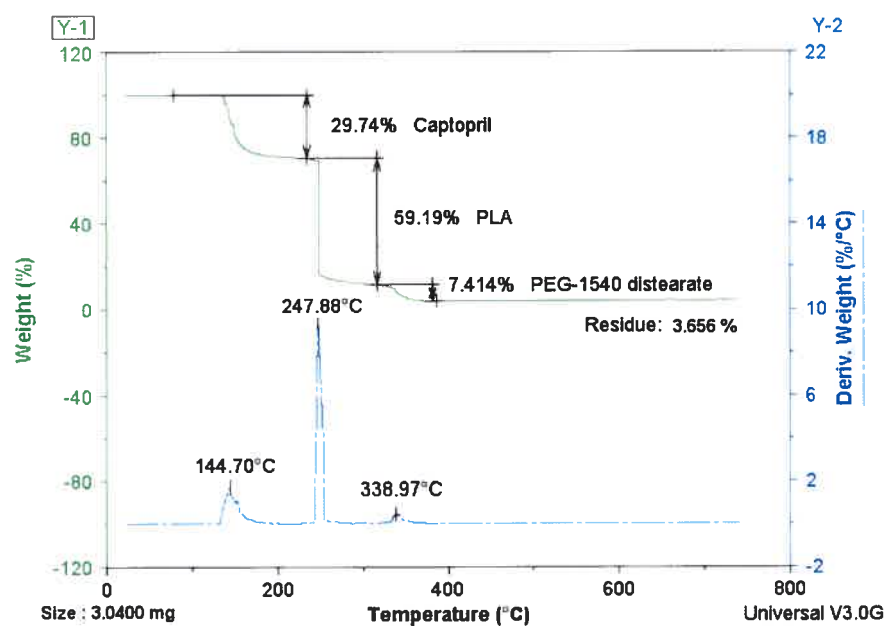


Figure IV - 2.3-9 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 30 %

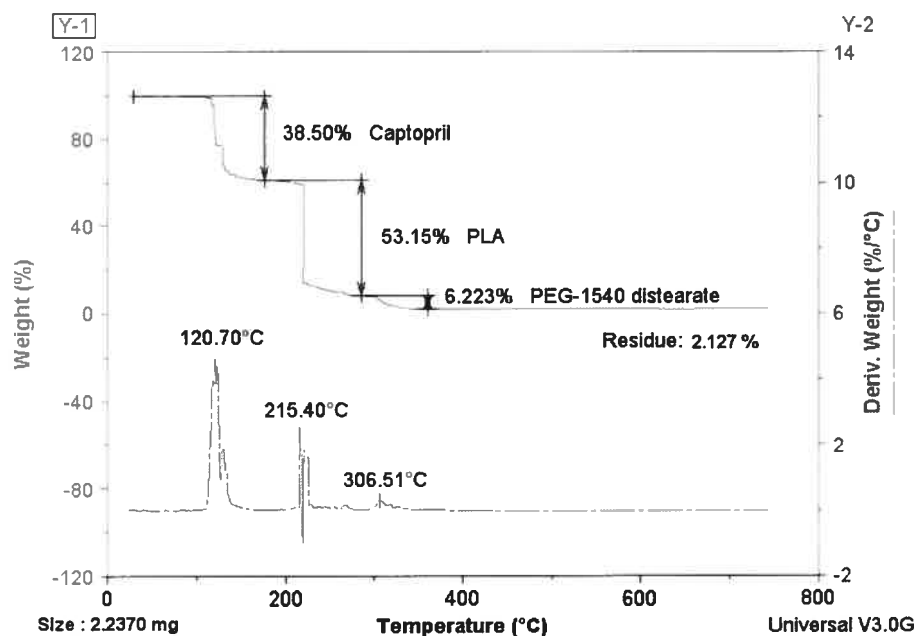


Figure IV - 2.3-10 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et Captopril. Taux de Captopril : 40 %

Le Tableau IV - 2.3-1 présente aussi la relation entre les paliers de dégradation thermique et les excipients présents dans les microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG-1540 distéarate, selon différentes teneurs de Captopril. La lecture de ce tableau indique que les écarts des paliers de dégradation thermique par rapport aux teneurs théoriques respectives des produits microencapsulés ne semblent pas dépasser 10 %.

Suites à ces constatations, il semble que l'analyse thermogravimétrique à haute résolution pourrait être une autre possibilité de quantifier précisément le Captopril dans des microsphères polymériques à base de PLA, puisqu'il y a une bonne corrélation entre le nombre de paliers de dégradation thermique et les constituants des microsphères. Cette nouvelle voie analytique, qui utilise la haute résolution serait effectivement très intéressante en particulier dans le cas du Captopril. En effet, la présence d'un groupement chimique thiol, au sein d'une molécule, par exemple comme le Captopril, confère à la molécule une instabilité en milieu liquide. Les dosages analytiques du Captopril ont de ce fait toujours

été très délicats, puisque cette molécule se dégrade plus facilement en milieu aqueux qu'en milieu organique.

Teneurs théoriques des produits dans les microsphères (%)			Paliers de dégradation thermique (%)			Température de dégradation thermique (°C)			Écart par rapport à la valeur théorique (%)		
Captopril	PLA (95 248 PM)	PEG-1450 distéarate	1 ^{ier} palier	2 ^{ième} palier	3 ^{ième} palier	1 ^{ier} palier	2 ^{ième} palier	3 ^{ième} palier	1 ^{ier} palier Captopril	2 ^{ième} palier PLA	3 ^{ième} palier PEG-1540 distéarate
10	80	10	9.32	76.97	9.33	131.58	232.27	302.54	6.80	3.78	6.70
20	71.12	8.88	19.74	68.36	8.94	147.23	248.51	334.28	1.30	3.88	0.67
30	62.23	7.77	29.74	59.19	7.41	144.70	247.88	338.97	0.86	4.88	4.63
40	53.33	6.67	38.50	53.15	6.22	120.70	215.40	306.51	3.75	0.34	6.75

Tableau IV - 2.3-1 Relation entre les paliers de dégradation thermique et les excipients présents dans des microsphères de PLA (95 248 PM) avec du PEG-1540 distéarate et selon différentes teneurs de Captopril (10 %, 20 %, 30 % et 40 %).

Les Figures IV – 2.3-11, IV – 2.3-12, IV – 2.3-13 et IV – 2.3-14 représentent les thermogrammes de TGA des microsphères composées de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809 selon les teneurs respectives 10 %, 20 %, 30 % et 40 %.

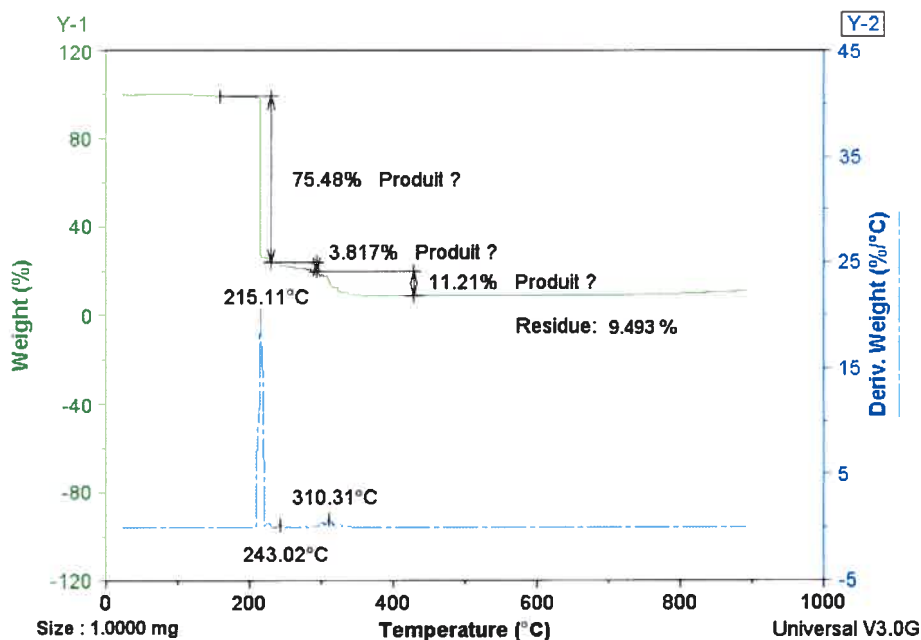


Figure IV - 2.3-11 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 10 %

Toutes ces figures indiquent la présence d'un palier de dégradation thermique majeure qui représente 75,48 %, 71,13 %, 62,06 % et 55,71 % lorsque les microsphères de PLA (95 248 PM), avec PEG-1540 distéarate, contiennent respectivement 10 %, 20 %, 30 % et 40 % de L-158,809. Ces paliers majeurs de dégradation, dont les températures de dégradation thermique maximales sont 215,11 °C, 207,63 °C, 192,06 °C, 199,24 °C, pourraient être identifiés à la dégradation thermique du polymère, puisque le PLA (95 248 PM) utilisé a un pic de dégradation thermique maximale à 214,62 °C (Figure IV – 2.3-1) ou 218,55 °C (Figure IV – 2.3-5), selon l'état brut ou la forme microsphère.

Mais l'évaluation de ces figures ne permet pas d'identifier avec certitude, voire estimer adéquatement, les paliers de dégradation thermique correspondant au PEG-1540 distéarate et ceux correspondant au L-158,809.

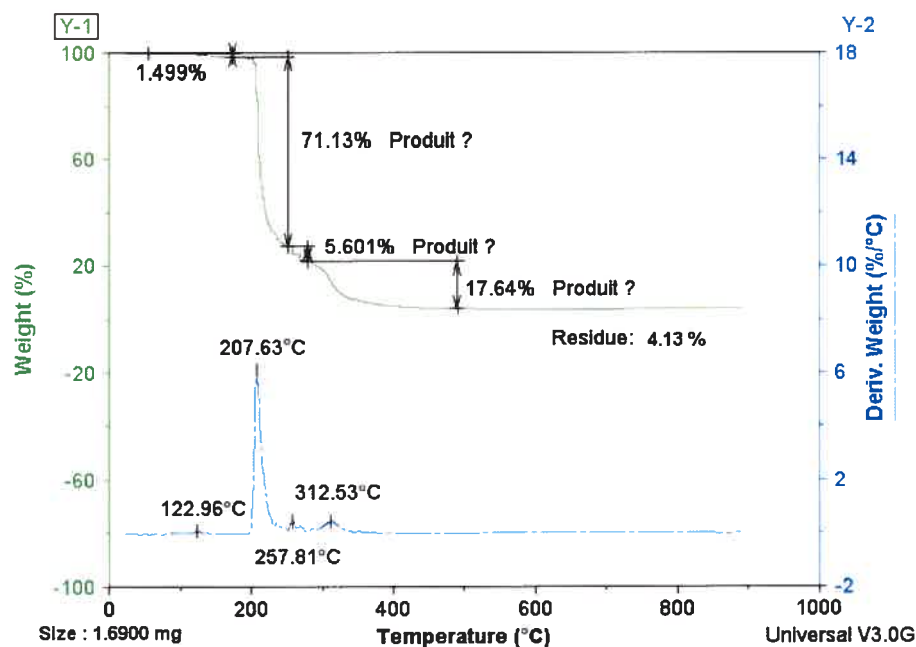


Figure IV - 2.3-12 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 20 %

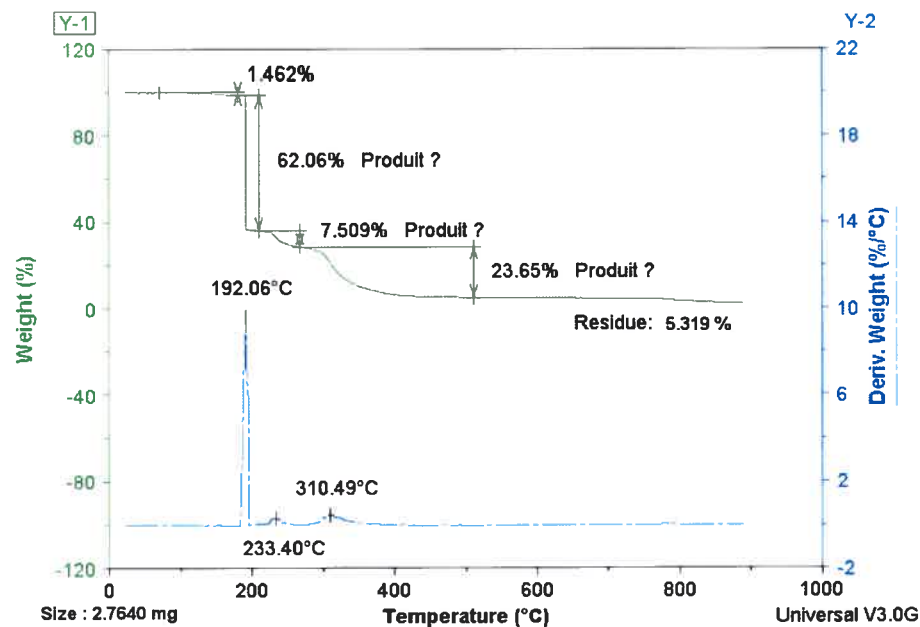


Figure IV - 2.3-13 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 30 %

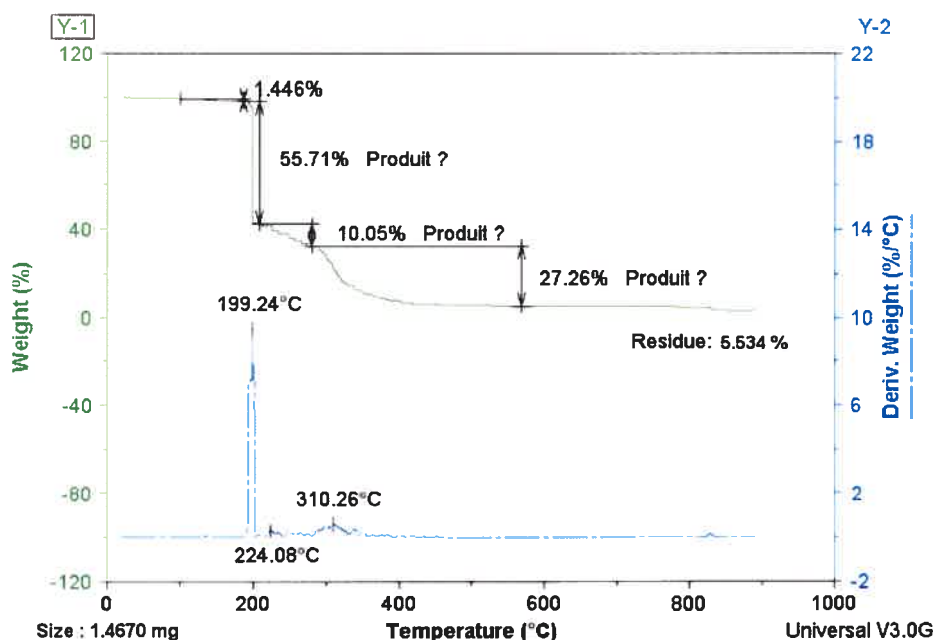


Figure IV - 2.3-14 Thermogramme de TGA de microsphères de PLA (95 248 PM), PEG-1540 distéarate et L-158,809. Taux de L-158,809 : 40 %

En définitive, il apparaît que par l'analyse thermogravimétrique à haute résolution il soit possible de corréler le nombre de paliers de dégradation thermique avec le nombre de constituants des microsphères polymériques de PLA. Cette observation semble ouvrir une voie possible de quantification des médicaments au sein de microsphères à condition que le médicament se dégrade avant les autres constituants des microsphères (cas des microsphères de PLA avec Captopril). Par contre, lorsqu'un constituant majeur, dans la composition des microsphères, se dégrade avant le médicament microencapsulé, il ne semble pas être possible de quantifier le principe actif à cause de la présence probable de multiples interactions avec le principe actif, par exemple entre les produits de dégradations de ce composé majeur et le médicament (cas des microsphères de PLA avec L-158,809).

IV - 2.3.2 Analyse enthalpique différentielle

L'analyse enthalpique différentielle a été effectuée dans le but de mieux comprendre d'une part les effets de la nébulisation sur le comportement thermique des polymères, d'autre part les effets d'une trempe sur la transition vitreuse des microsphères de PLA et enfin, son importance dans le contrôle de principes actifs microencapsulés dans du PLA.

IV - 2.3.2.1 Effets de la nébulisation sur le comportement thermique des polymères

La Figure IV – 2.3-15 représente des thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLA 95 248 PM.

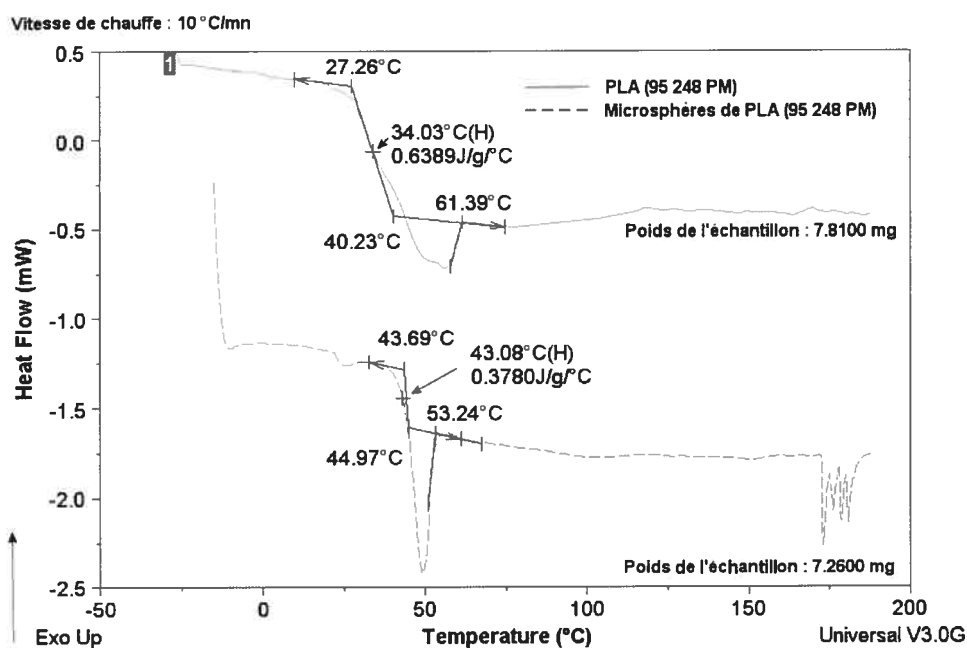


Figure IV - 2.3-15 Thermogrammes de DSC montrant l'effet du processus de nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLA 95 248 PM.

Le processus de nébulisation qui a permis l'obtention de microsphères semble augmenter de manière significative la température de transition vitreuse (« T_g » pour *glass transition*) car lorsque le polymère n'est pas sous forme de microsphère, sa T_g est plus faible et situé à 34,03 °C alors qu'il s'élève à 43,08 °C quand il est sous forme de microsphère (après nébulisation). En d'autres termes, les microsphères de ce PLA adoptent un état caoutchouteux à 43,08 °C, alors que le polymère brut, pas sous la forme de microsphère, devient caoutchouteux à une température plus basse (34,03 °C). Par conséquent, il serait possible de conserver ces microsphères de PLA 95 248 PM à la température ambiante, c'est à dire 25 °C, sans nécessairement amener un réarrangement trop significatif et trop rapide des chaînes polymériques.

Par ailleurs, la valeur de la variation de la capacité calorifique (ΔC_p) à la T_g affiche une diminution de 40,83 % dans le cas des microsphères (0,3780 J/g/°C), sa forme brute indiquant 0,6389 J/g/°C. Le polymère semble donc beaucoup plus amorphe sous sa forme brute que sous la forme de microsphère. Le processus de nébulisation semble avoir baissé significativement la variation de la capacité calorifique dans le cas de ce polymère très amorphe au départ. Le processus rapide de nébulisation aurait aussi permis une disposition des chaînes polymériques, de manière moins désordonnée et l'adoption de la forme sphérique, qui est la morphologie énergétique la plus stable, contribuerait aussi à favoriser et renforcer une disposition déjà stable des chaînes. En d'autres termes, au sein de la forme microsphérique de ce PLA, où coexistent des régions amorphes et des régions cristallines, il y aurait un plus grand nombre de régions ordonnées de chaînes polymériques, c'est à dire plus de zones cristallines, qu'au sein de la forme brute.

Enfin, la courbe de DSC du polymère sous forme brute présente une relaxation enthalpique au niveau de la transition vitreuse, qui devient plus accentuée après que le polymère ait subi la nébulisation pour passer à la forme microsphérique. La présence de ce pic endothermique de relaxation enthalpique signifie que la microsphère polymérique doit absorber plus d'énergie calorifique pour atteindre l'enthalpie de l'état caoutchouteux.

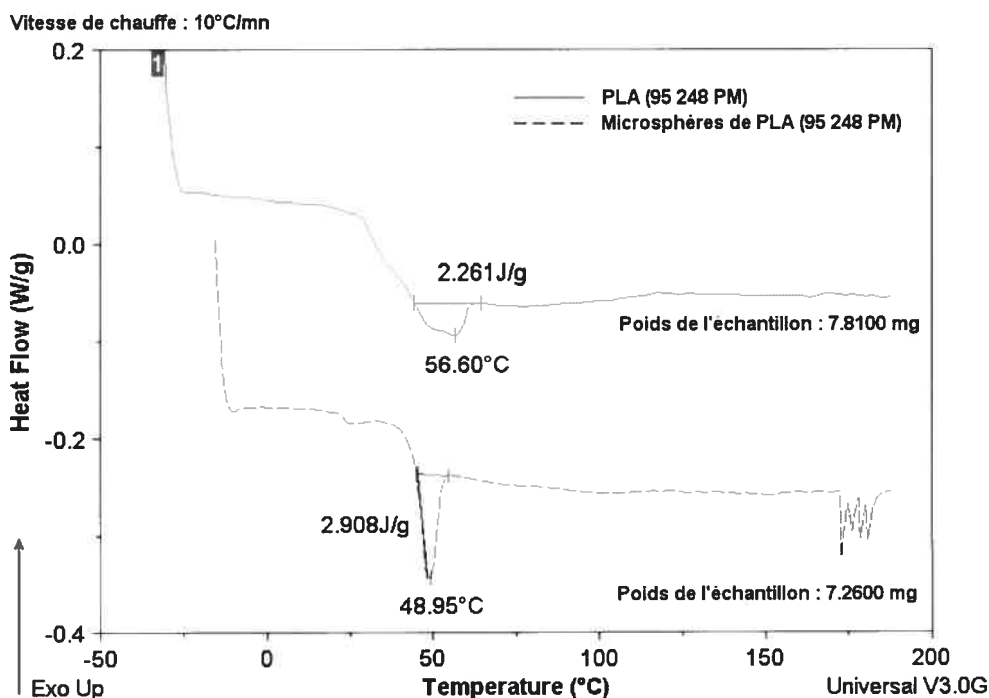


Figure IV - 2.3-16 Thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLA 95 248 PM.

La Figure IV – 2.3-16 représente des thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLA 95 248 PM.

Lorsque le polymère est sous forme brute, le pic endothermique de relaxation enthalpique a une chaleur de fusion de 2,261 J/g. Par contre, lorsqu'il est sous forme microsphérique, cette valeur atteint 2,908 J/g.

Par conséquent, il semble donc que la nébulisation ait entraîné une augmentation de 28,61 % de la chaleur de fusion au niveau du pic endothermique de relaxation enthalpique du polymère. Autrement dit, lorsque ce PLA est sous la forme microsphérique, il conserve un excès d'enthalpie.

Afin de vérifier que ces observations s'appliquent aussi aux mêmes polymères mais de poids moléculaire différent, la même étude a été entreprise avec le PLA 49 898 PM.

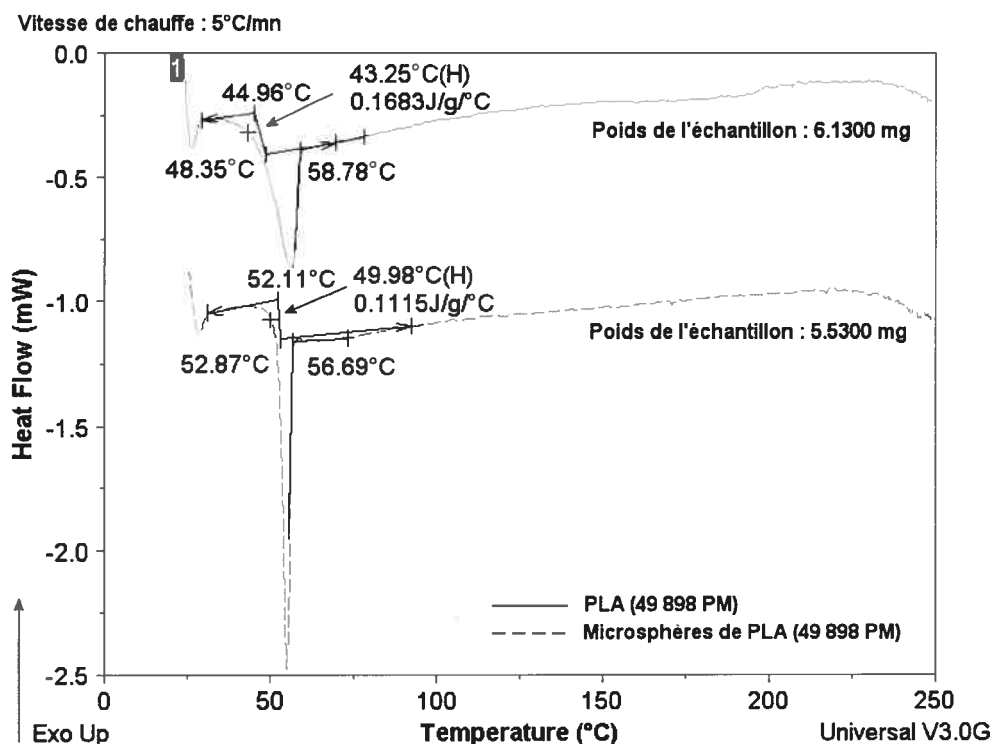


Figure IV - 2.3-17 Thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLA 49 898 PM.

La Figure IV – 2.3-17 représente des thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLA 49 898 PM.

La Tg du PLA 49 898 PM se révèle être plus grand que celui du PLA 95 248 PM, que le polymère soit sous la forme brute ou sous la forme microsphérique. En d'autres termes, lorsque la température augmente, le PLA 95 248 PM parviendrait à l'état caoutchouteux avant le PLA 49 898 PM, peu importe la forme du polymère, brute ou microsphérique. Ce résultat semble surprenant car la masse moléculaire est un facteur qui affecte la Tg. En effet, la littérature rapporte que, dans la région des petites masses moléculaires, (c'est à dire de l'oligomère à $PM_n \approx 1 \times 10^4$) la Tg du polystyrène augmente

en même temps que la masse moléculaire relative, mais plafonne à une valeur limite, dans la région des hautes masses moléculaires ^[275].

En fait, comme les extrémités des chaînes polymériques possèdent une plus grande liberté de mouvement que les segments au centre des chaînes, elles auraient, en quelque sorte, plus de volume libre. Ainsi, les chaînes de bas poids moléculaires, qui ont plus d'extrémités par unité de volume que les longues chaînes, auront un volume libre plus élevé et donc une Tg plus petit. À titre indicatif, Fox et Flory ont exprimé cette relation entre la

masse moléculaire et la Tg, dans l'équation suivante :

$$T_g = T_g^\infty - \frac{K}{M_w}$$

où les termes sont :

T_g est la température de transition vitreuse

T_g^∞ est la température de transition vitreuse du polymère si ce dernier avait une masse moléculaire relative infinie.

M_w est la masse moléculaire relative moyenne, en poids.

K est une constante

En conséquence, le PLA 95 248 PM, qui a une masse moléculaire en poids plus grand, devrait avoir une Tg plus élevée que le PLA 49 898 PM. Or la présence de chaînes plus courtes dans l'échantillon de polymère, contribue à abaisser la Tg et joue ainsi un rôle de plastifiant. Donc, une large distribution de la masse moléculaire est le signe de la présence de courtes chaînes. C'est pourquoi, il peut s'avérer utile de déterminer pour les deux PLA, un indicateur de dispersion de la distribution de masse moléculaire en nombre, en particulier l'écart type.

D'après le laboratoire fournisseur :

- Le PLA 95 248 PM possède les caractéristiques suivantes :
 - Masse moléculaire moyenne en poids : $M_w = 95\,248$
 - Masse moléculaire moyenne en nombre : $M_n = 40\,543$

○ Indice de polydispersité : $I = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = 2,35$

- Le PLA 49 848 PM possède les caractéristiques suivantes :

○ Masse moléculaire moyenne en poids : $M_w = 49\,898$

○ Masse moléculaire moyenne en nombre : $M_n = 20\,054$

○ Indice de polydispersité : $I = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = 2,49$

La formule de l'écart type est la suivante (Annexe VII-A) :

$$\sigma_n = \sqrt{\sigma_n^2} = \sqrt{\overline{M}_n^2 \left(\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} - 1 \right)}$$

L'application numérique donne :

- Pour le PLA 95 248 PM :

○ Une variance égale à 2219042046

○ Un écart type égale à 47107

- Pour le PLA 49 898 PM :

○ Une variance égale à 599222745

○ Un écart type égale à 24479

L'écart type de la fonction de distribution de masse moléculaire en nombre est supérieur dans le cas du polymère PLA 95 248 PM comparativement au polymère PLA 49 898 PM, ce qui semble indiquer une distribution de masse moléculaire en nombre plus large. L'échantillon de PLA 95 248 PM comporterait alors plus de courtes chaînes de polymère que l'échantillon PLA 49 898 PM, ce qui expliquerait ainsi sa valeur de Tg plus petite.

Par ailleurs, il est à noter que l'indice de polydispersité ou indice de polymolécularité qui représente l'inhomogénéité du degré de polymérisation, pouvait difficilement être utilisé comme indicateur de la largeur de la distribution de masse moléculaire car il aurait fallu que les deux polymères de PLA aient la même masse moléculaire en nombre (M_n).

De plus, la valeur de la ΔC_p du PLA 49 898 PM forme brute, à la T_g , affiche 0,1683 J/g/°C alors qu'elle est 0,6389 J/g/°C dans le cas du PLA 95 248 PM forme brute. Ces résultats montrent que, sous leur forme brute, ces deux polymères ont des caractères, amorphe et cristallin, très différents. En effet, le PLA 95 248 PM, est plus amorphe que le PLA 49 898 PM, brut et son haut caractère amorphe contribue à expliquer aussi la valeur plus basse de sa T_g . Le PLA 95 248 PM atteint l'état caoutchouteux plus vite.

Comme précédemment, des observations équivalentes sont rapportées dans le cas de ce PLA 49 898 PM :

- La nébulisation semble augmenter de manière significative la T_g , comme dans le cas du PLA 95 248 PM. En effet, lorsque le PLA 49 898 PM est sous sa forme microsphérique, sa T_g est 49,98 °C alors qu'il ne s'élève qu'à 43,25 °C, lorsqu'il est sous sa forme brute.
- La valeur de la ΔC_p à la T_g affiche une baisse de 33,74 % dans le cas de la microsphère (0,1115 J/g/°C), la forme brute indiquant 0,1683 J/g/°C.

Ce PLA 49 898 PM est à l'origine moins cristallin sous sa forme brute que sous sa forme de microsphère. La nébulisation du polymère, qui semble avoir diminué significativement la variation de la capacité calorifique (ΔC_p), aurait contribué à augmenter le nombre de régions cristallines dans la forme microsphérique.

- La courbe de DSC du polymère, sous forme brute, présente une relaxation enthalpique au niveau de la transition vitreuse, qui devient plus accentuée après que le polymère ait subi la nébulisation pour passer à la forme microsphérique.

Compte tenu que ces observations évoluent dans le même sens que celles du PLA 95 248 PM, les mêmes interprétations pourraient s'y appliquer également. La Figure IV – 2.3-18 représente des thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLA 49 898 PM. Lorsque le polymère est sous forme brute, son pic endothermique de relaxation enthalpique a une chaleur de fusion de 5,687 J/g. Par contre, lorsque le polymère est sous forme microsphérique, sa valeur atteint 6,980 J/g. Par

conséquent, il semble donc que la nébulisation ait permis une augmentation de 22,73 % de la chaleur de fusion au niveau du pic endothermique de relaxation enthalpique du polymère. Autrement dit, lorsque le polymère PLA 49 898 PM est sous la forme de microsphère, il conserve un excès d'enthalpie.

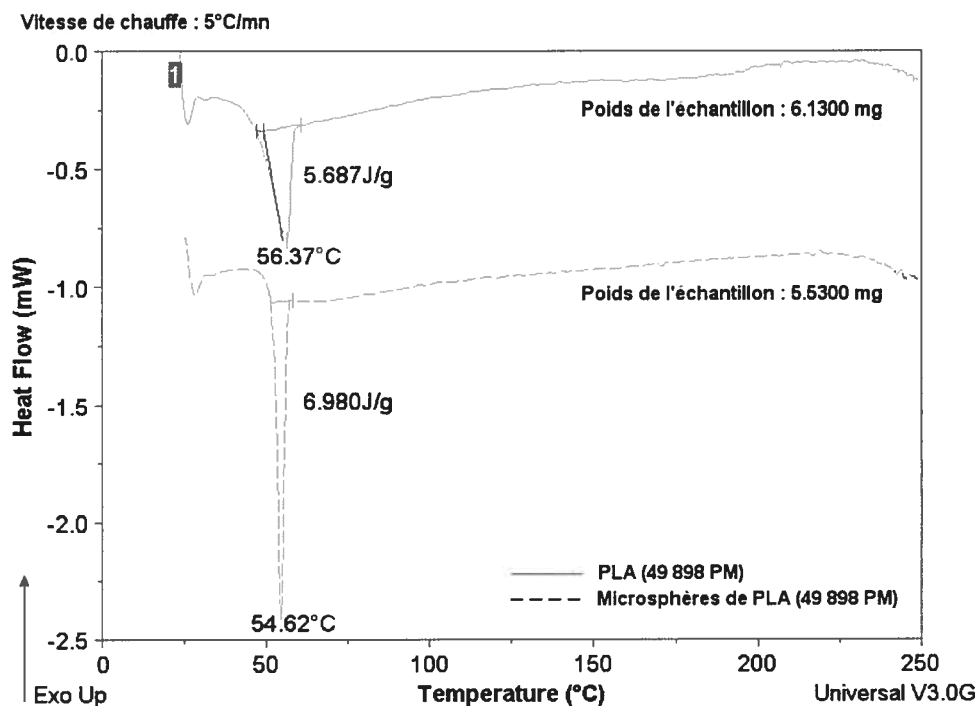


Figure IV - 2.3-18 Thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLA 49 898 PM.

Par ailleurs, comme l'échantillon brut de PLA 49 898 PM affiche un pic de relaxation enthalpique supérieur à l'échantillon brut de PLA 95 248 PM, cela signifie que la demande énergétique pour atteindre l'état caoutchouteux est plus élevée dans le cas du PLA 49 898 PM que dans celui du PLA 95 248 PM. Le même raisonnement est également applicable pour les microsphères de PLA.

Afin de vérifier si les interprétations avancées dans le cas du système polymérique PLA pourraient également s'appliquer à d'autres polymères, le PLGA RG504 (48 000 PM) servira de modèle.

La Figure IV – 2.3-19 représente des thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLGA RG504 (48 000 PM). La T_g du PLGA est légèrement plus grande sous sa forme de microsphère (49,68 °C) que sous sa forme brute (49,54 °C). Mais contrairement aux deux polymères de PLA étudiés, la différence affichée entre les deux valeurs de T_g , dans le cas des PLGA, forme brute et forme microsphérique, ne semble guère majeure car elle n'est que de 0,28 %. Néanmoins, le passage à la forme microsphère du polymère semble diminuer de façon majeure la variation de la capacité calorifique (ΔC_p). En effet, la valeur de la ΔC_p à la T_g affiche une baisse de 59 % dans le cas de la microsphère (0,1066 J/g/°C), la forme brute indiquant 0,26 J/g/°C. La forme microsphère du PLGA serait plus cristalline que sa forme brute. De plus, le tracé de DSC du PLGA, sous forme brute, présente également une relaxation enthalpique au niveau de la transition vitreuse, qui augmente après que le polymère soit passé sous la forme microsphérique.

La Figure IV – 2.3-20 représente des thermogrammes de DSC, montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLGA 48 000 PM. Lorsque le polymère est sous forme brute, le pic endothermique de relaxation enthalpique a une chaleur de fusion de 6,281 J/g. Par contre, dans le cas du PLGA sous la forme de microsphère, cette valeur atteint 7,105 J/g. Autrement dit, il y a une augmentation de 13,11 % entre la T_g de la microsphère de PLGA et la T_g de la forme brute de PLGA. Comme pour les deux échantillons de PLA, les microsphères de PLGA 48 000 PM conservent un excès d'enthalpie. En conséquence, il semble que la nébulisation ait entraîné une augmentation de 13,11 % de la chaleur de fusion au niveau du pic endothermique de relaxation enthalpique du polymère.

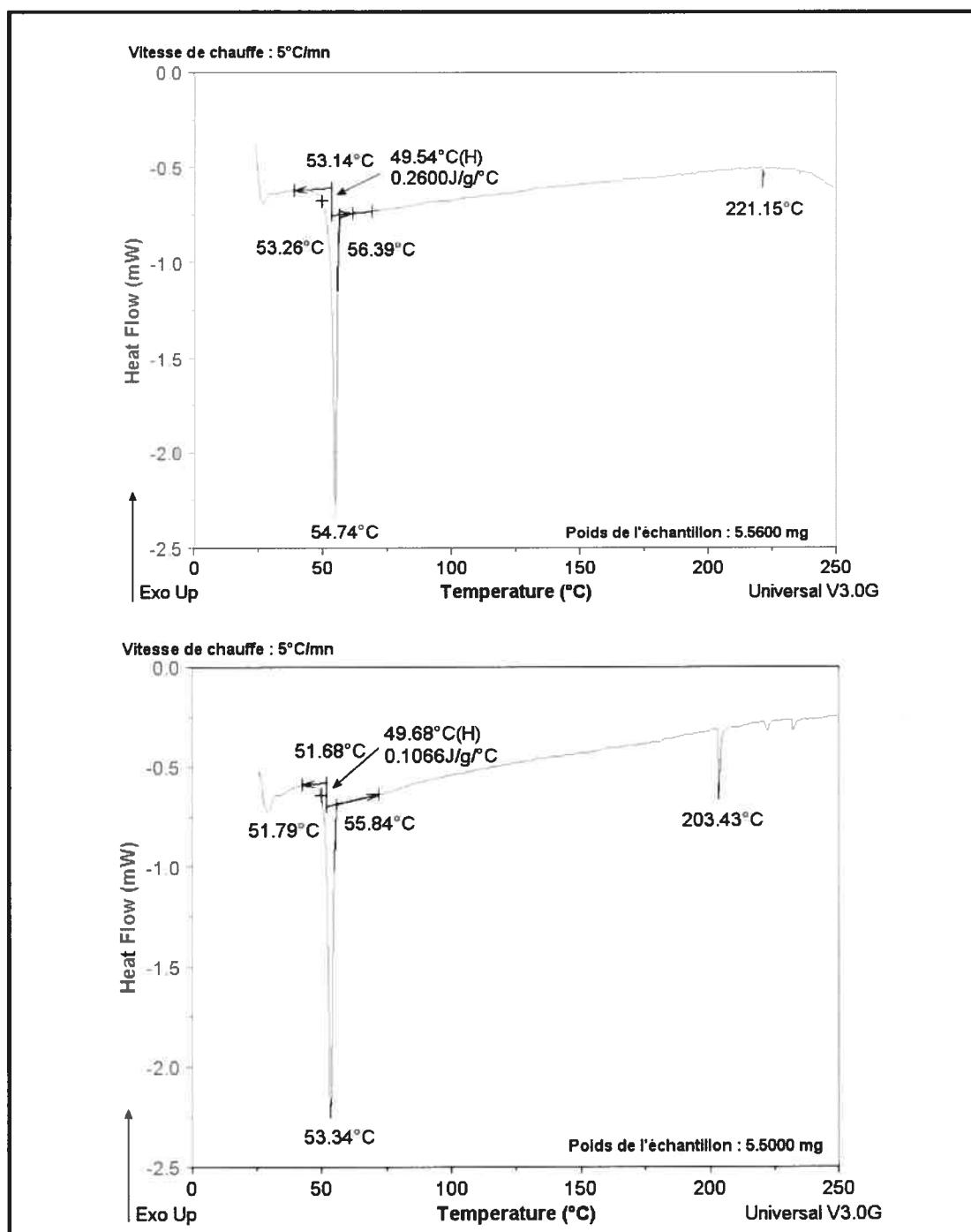


Figure IV - 2.3-19 Thermogrammes de DSC montrant l'effet de la nébulisation sur la transition vitreuse du polymère de PLGA RG504 (48 000 PM) ; Figure du haut : forme brute (avant nébulisation) ; Figure du bas : forme microsphère (après nébulisation).

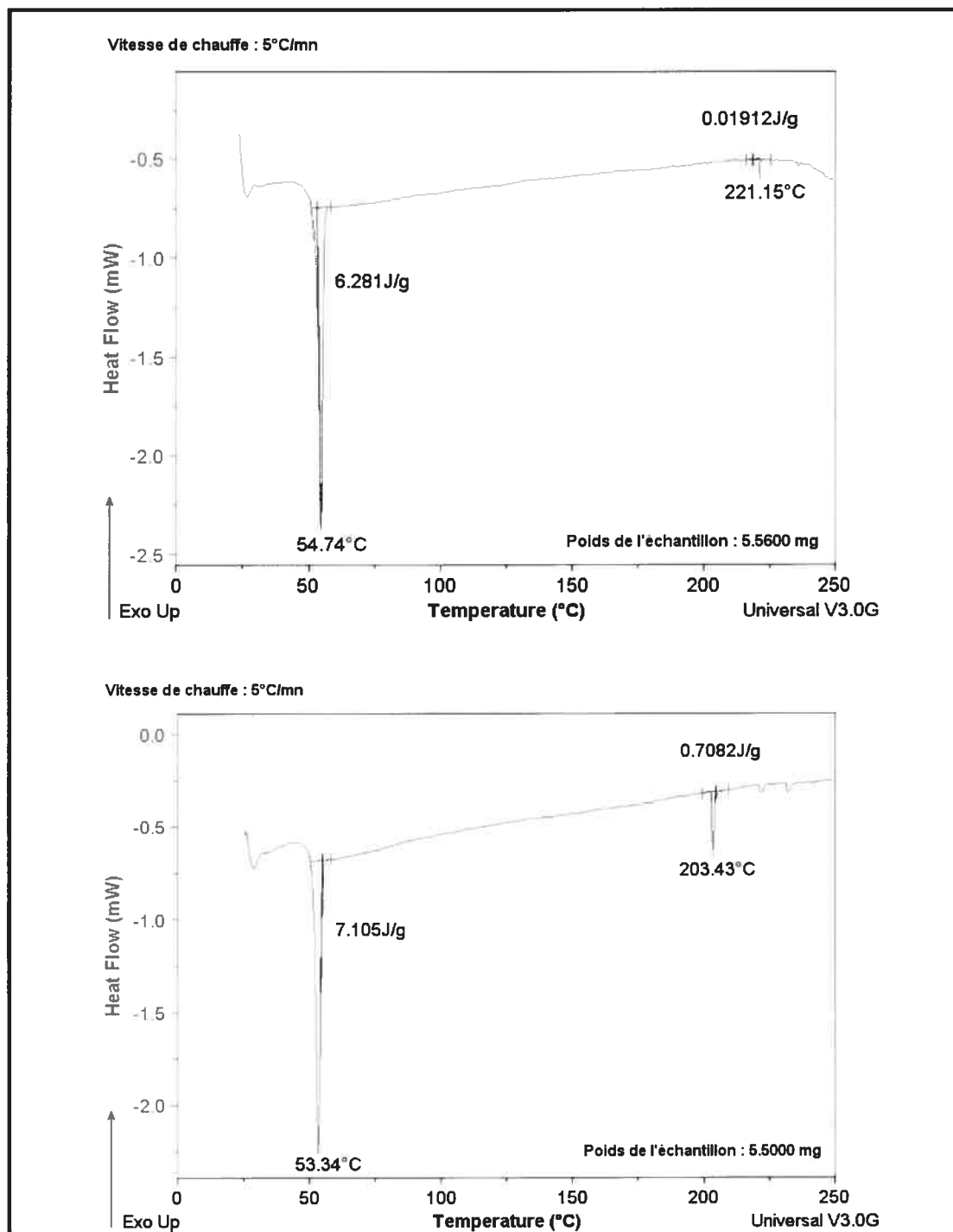


Figure IV - 2.3-20 Thermogrammes de DSC montrant l'effet de la nébulisation sur la relaxation enthalpique du polymère de PLGA RG504 (48 000 PM) ; Figure du haut : forme brute (avant nébulisation) ; Figure du bas : forme microsphère (après nébulisation).

IV - 2.3.2.2 Effets d'une trempe sur la transition vitreuse des microsphères de PLA.

Après une chauffe de l'échantillon au-delà de la transition vitreuse, la trempe est l'étape suivante dictée par un refroidissement en deçà de la T_g de l'échantillon puis d'une seconde chauffe au-delà de cette T_g .

Avec une T_g plus grande, un excès d'enthalpie et une variation de la capacité calorifique plus faible au niveau de la transition vitreuse, les microsphères de PLA nébulisées pouvaient constituer un modèle intéressant pour évaluer l'effet d'une trempe sur la transition vitreuse.

La Figure IV – 2.3-21 représente une trempe sur le polymère PLA (95 248 PM) sous sa forme brute.

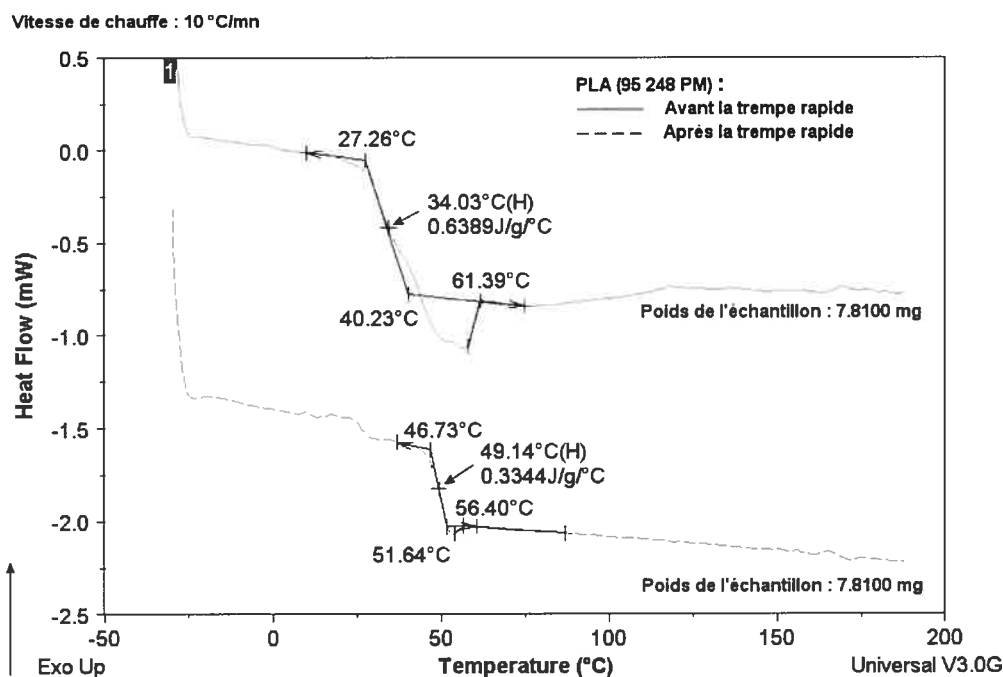


Figure IV - 2.3-21 Effet d'une trempe sur le polymère PLA (95 248 PM) sous sa forme brute.

En dessous de la T_g , les chaînes de polymère n'ont pas assez d'énergie pour se réarranger et pour subir une rotation. Il s'agit de l'état vitreux et le polymère est dit vitreux ou cassant. Lorsque l'échantillon est chauffé, il apparaît alors une légère augmentation en volume et en énergie car les chaînes de polymères commencent à acquérir une plus grande liberté de mouvement. Jusqu'à la T_g , le polymère devient plus caoutchouteux. C'est pourquoi, au niveau de la T_g , la capacité calorifique de l'échantillon augmente car les chaînes de polymère acquièrent un plus grand degré de liberté. Lorsque la température de chauffe dépasse la transition vitreuse du polymère, le polymère est complètement dans un état caoutchouteux, c'est à dire qu'il est liquide. Dans cet état caoutchouteux, les chaînes polymériques sont complètement mobiles et le polymère adopte un état d'équilibre stable, contrairement à l'état vitreux qualifié d'état d'équilibre non stable.

La trempe, qui amène rapidement la température de l'échantillon à $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pour effet de fixer les chaînes de polymères dans un état qui ne leur permet plus de liberté de mouvement, et qui ne leur laisse plus la possibilité de se réarranger. Les chaînes sont passées très rapidement d'un état caoutchouteux où elles étaient mobiles à un état vitreux.

La littérature a rapporté que la vitesse de refroidissement, au cours d'une trempe, influence la variation de la capacité calorifique, donc la cristallinité. Plus le refroidissement est lent, plus le polymère a le temps de se recristalliser avec pour résultat une composition cristalline plus grande, donc une composante amorphe plus petite, et une diminution de la capacité calorifique.

Mais, dans le cas de la Figure IV – 2.3-21, il semble que la trempe rapide de l'échantillon ne l'ait pas été suffisamment pour augmenter la composante amorphe. La conséquence résulte en une baisse de la variation de la capacité calorifique de 47,66 %, indicatrice d'une augmentation de la composition cristalline de l'échantillon du polymère. Il est fort intéressant aussi de remarquer l'absence du pic endothermique de relaxation enthalpique après la trempe. Ce manque indique que l'échantillon polymérique ne conserve plus un excès d'enthalpie après le processus de trempe.

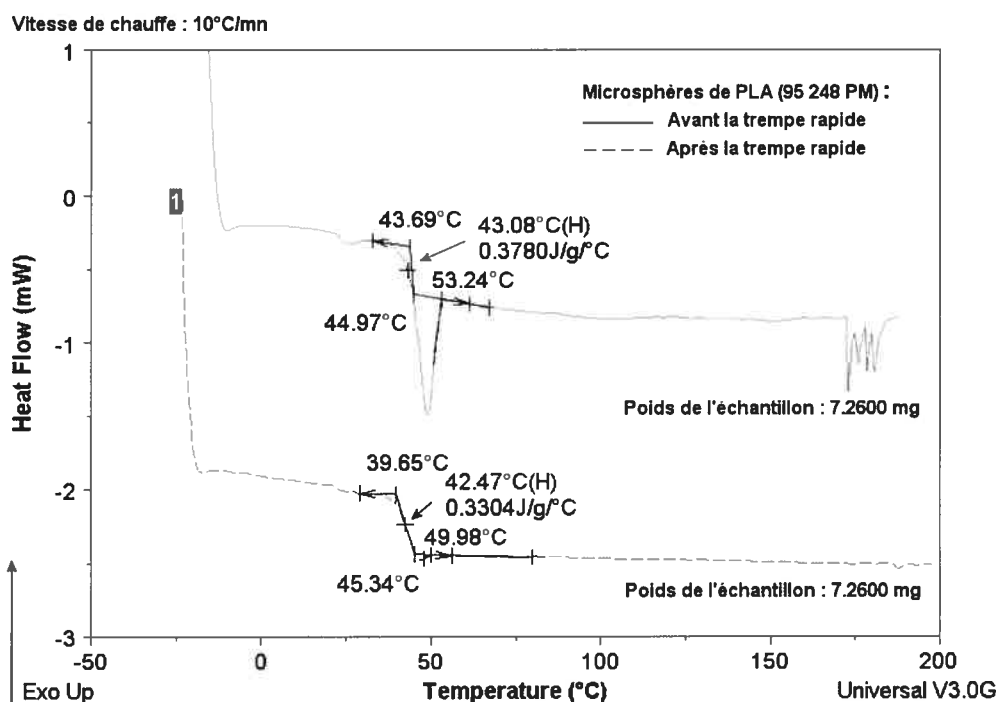


Figure IV - 2.3-22 Effet d'une trempe sur des microsphères de PLA (95 248 PM).

La Figure IV – 2.3-22 montre l'effet d'une trempe sur des microsphères de PLA 95 248 PM. La trempe était possible car les microsphères n'avaient pas été dégradées après leur première chauffe jusqu'à 200 °C.

Les résultats de cette figure indiquent :

- Une légère baisse de la T_g des microsphères de 1,41 %, passant de 43,08 °C (avant trempe) à 42,47 °C (après trempe). La trempe semble avoir eu un effet très modeste, voire peu significatif sur la transition vitreuse.
- Une baisse de la capacité calorifique de 12,60 %, indicatrice d'une augmentation de la composante cristalline dans l'échantillon de microsphère polymérique.
- L'absence du pic endothermique de relaxation enthalpique est obtenue après la trempe. Les microsphères ne conservent plus un excès d'enthalpie dans leurs chaînes.

Dans la littérature, plusieurs auteurs, en particulier Mathot^[276], avaient déjà relevé la présence d'une relaxation enthalpique lors d'analyses thermiques par DSC de différents polymères semi-cristallins. La présence d'un pic de relaxation enthalpique peut parfois gêner la détermination de la température de transition vitreuse.

Dans le but de mieux apprécier la compréhension du pic de relaxation enthalpique dans les cas des microsphères polymériques présentées précédemment, il peut être intéressant de mentionner différents thermogrammes obtenus par Groenewoud à partir d'un polymère rigide, qui présente une relaxation enthalpique au niveau de sa phase de transition vitreuse^[277]. La Figure IV - 2.3-23 illustre ces thermogrammes. Dans cet exemple, la Tg a été déterminée par la méthode dite « onset » c'est à dire que le point d'intersection des deux premières tangentes de la phase de transition vitreuse donne la Tg.

La partie A montre deux thermogrammes d'une résine époxy linéaire.

- Le thermogramme du haut a été obtenu en analysant cette résine avec une vitesse de chauffe de 20 °C/minute sans aucun traitement thermique préalable.
- Le thermogramme du bas a été obtenu en analysant le même échantillon de résine, qui a été préchauffé à 150 °C pendant une minute, puis rapidement refroidi (autrement dit, il s'agit d'une trempe), à la vitesse de refroidissement de 320 °C/minute, jusqu'à la température ambiante avant de l'analyser dans les mêmes conditions (c'est à dire avec une vitesse de chauffe de 20 °C/minute).

Il apparaît dans ce thermogramme du bas un déplacement du Tg avec une diminution du pic de relaxation enthalpique.

Les parties B et C illustrent les effets de la vitesse de refroidissement (vitesse de la trempe) ainsi que les effets du vieillissement (étude de stabilité) à la température ambiante sur la phase de transition vitreuse du même échantillon de polymère ce qui permet également par la même occasion d'apprécier aussi les effets de la présence d'une relaxation enthalpique sur la phase de transition vitreuse. La partie B montre que plus la vitesse de refroidissement est grande, plus le pic de relaxation enthalpique tend à disparaître. La partie C montre que plus l'échantillon de résine est âgé, plus le pic de relaxation enthalpique demeure visible, au point de sembler identique au pic de relaxation enthalpique

de l'échantillon qui avait été analysé à 20 °C/minute, sans traitement thermique préalable (thermogramme du haut de la partie A), malgré pourtant une trempe très rapide (vitesse de refroidissement 320 °C/minute) suivant une préchauffe jusqu'à 150 °C.

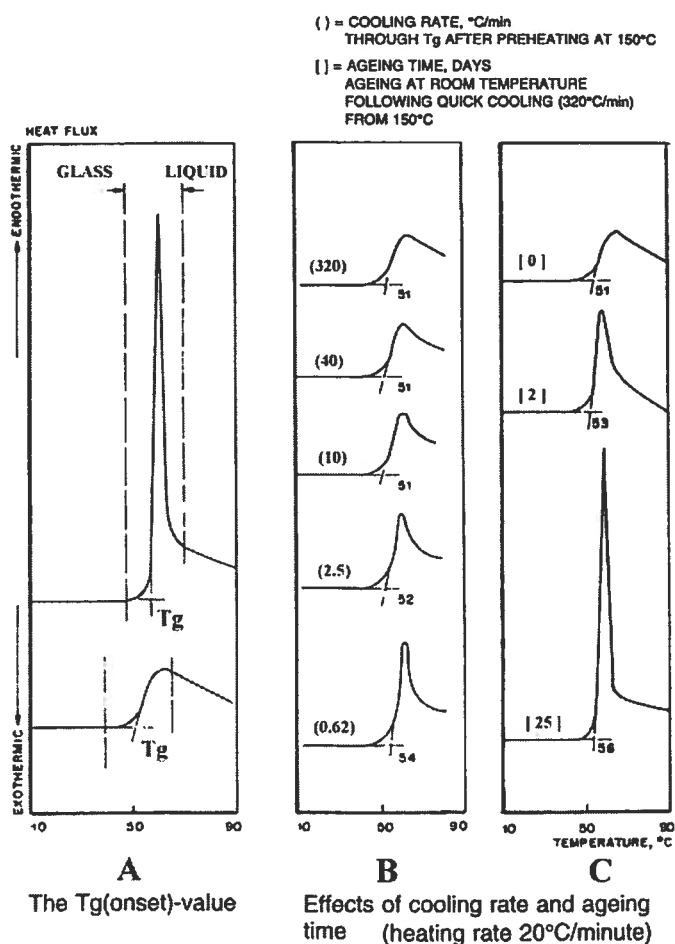


Figure IV - 2.3-23 Exemples de thermogrammes d'une résine époxy linéaire avec une relaxation enthalpique au niveau de la transition vitreuse. Effet de la vitesse de refroidissement (vitesse de la trempe) et effet du vieillissement (Tirée de Groenewoud, 2001^[277]).

En d'autres termes, la partie C illustre bien que plus un polymère semi-cristallin est âgé, plus il a tendance à se compacter, à être plus dense au point qu'il faille fournir plus

d'énergie calorifique pour atteindre l'état caoutchouteux, en partant de l'état vitreux. Ainsi, cet exemple permet de bien illustrer la relation qui peut exister entre la présence d'une relaxation enthalpique et le vieillissement d'un l'échantillon de polymère semi-cristallin.

En faisant le parallèle avec les résultats de la trempe, obtenus avec le polymère PLA 95 248 PM et les microsphères de PLA 95 248 PM, il est possible de dire que ces échantillons ne semblent pas avoir été affectés ni par une durée et ni par les conditions d'une conservation. Effectivement, le polymère PLA 95 248 PM avait été conservé au réfrigérateur à 5 °C. Quant à l'ensemble des microsphères, telles que les microsphères de PLA 95 248 PM, elles ont toujours été conservées au réfrigérateur à 5 °C, après leur production. D'autre part, puisque les résultats précédents des Figures IV-2.3-16, IV-2.3-18 et IV-2.3-20 indiquaient que le pic de relaxation enthalpique des microsphères de PLA (95 248 PM et 49 898 PM) et des microsphères de PLGA RG504 (48 000 PM) avaient une chaleur de fusion plus grande que le polymère lui-même (non nébulisé), il y aurait alors de fortes présomptions de croire que le processus de nébulisation, qui permettait la formation des microsphères, ait, par ce fait même, également contribué à compacter, voire à rendre plus dense les microsphères polymériques.

Comme le PEG-1540 distéarate est un excipient important de l'industrie pharmaceutique, il peut être intéressant de l'étudier au sein de microsphères de PLA et par la même occasion d'observer l'effet d'une trempe sur ces microsphères polymériques. Il appartient à la série des dérivés polyéthoxylés de l'acide stéarique. La Figure IV – 2.3-24 montre un thermogramme de DSC du PEG-1540 distéarate, dans lequel il est possible de détecter le pic de fusion de cet excipient. Le pic de fusion du PEG-1540 distéarate présente un maximum à 49,24 °C et possède une chaleur de fusion de 130,5 J/g. Le résultat de la température de fusion ne contredit pas celui présenté dans le Handbook of Pharmaceutical Excipients^[269] qui indique que le PEG-1540 distéarate, encore appelé poloxyl 32 distéarate, possède un point de fusion autour de 45 °C.

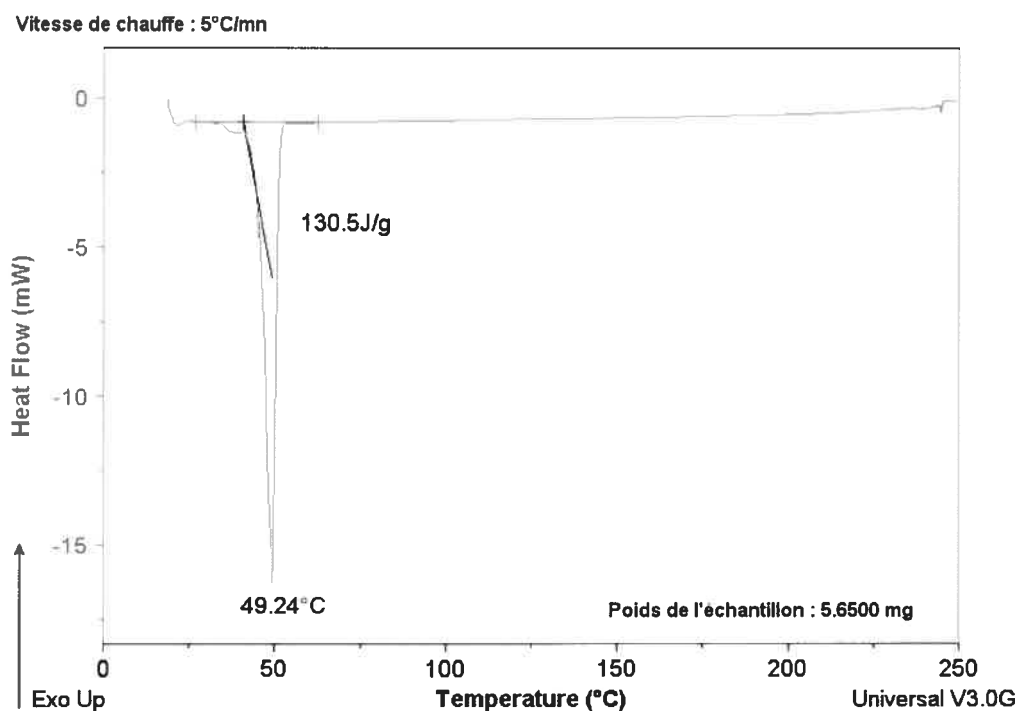


Figure IV - 2.3-24 Thermogramme de DSC du PEG-1540 distéarate.

La Figure IV – 2.3-25 montre l'effet d'une trempe rapide sur des microsphères de PLA 95 248 PM et PEG-1540 distéarate. Le thermogramme de DSC de l'échantillon avant la trempe rapide indique la présence d'une transition vitreuse et deux pics endothermiques. La T_g de cette formulation de microsphères a lieu à 29,83 °C. Le premier pic endothermique correspond à un pic endothermique de relaxation enthalpique dont le maximum est de 36,57 °C et la chaleur de fusion de 1,381 J/g. Le second pic endothermique, qui indique la fusion du PEG-1540 distéarate (précédemment, la fusion du PEG-1540 distéarate était trouvée à 49,24 °C) a un maximum à 45,62 °C et sa chaleur de fusion est 1,765 J/g. Par conséquent, le PEG-1540 distéarate ne serait pas à l'état moléculaire, dispersé au sein des microsphères mais il se présenterait plutôt sous la forme de plage dans un état cristallin.

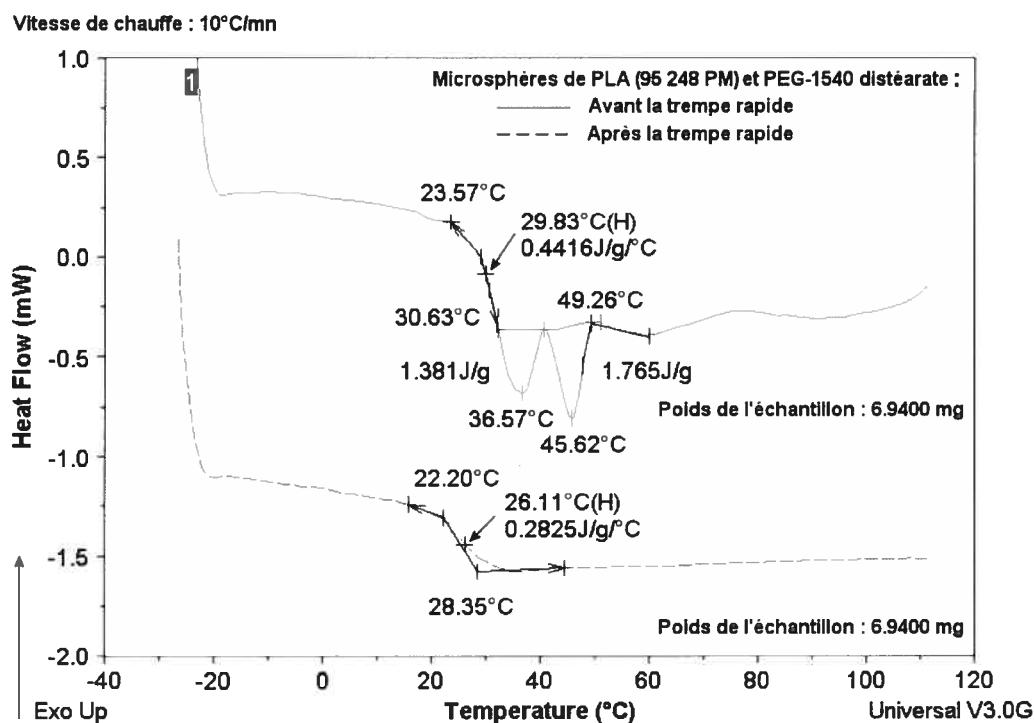


Figure IV - 2.3-25 Effets d'une trempe rapide sur des microsphères de PLA 95 248 PM et PEG-1540 distéarate.

L'effet d'une trempe rapide a contribué à diminuer de 12,47 % la T_g , qui passe ainsi de 29,83 °C à 26,11 °C et à accroître de 36 % la cristallinité de la formulation puisque la variation de la capacité calorifique passe de 0,4416 J/g/°C à 0,2825 J/g/°C.

Bien qu'il s'agisse d'une trempe rapide, le refroidissement de l'échantillon depuis 110 °C jusqu'à -25 °C ne semble pas avoir été suffisamment rapide pour permettre d'augmenter le caractère amorphe de ces microsphères. Autrement dit, la trempe aurait fourni l'occasion aux chaînes de polymères de se positionner et former plus de régions cristallines au sein de l'édifice polymérique amorphe.

IV - 2.3.2.3 Application de l'analyse enthalpique différentielle dans le contrôle de principes actifs microencapsulés dans du PLA.

Des thermogrammes de DSC ont été réalisés sur deux modèles de principes actifs : le L-158,809 et le Captopril.

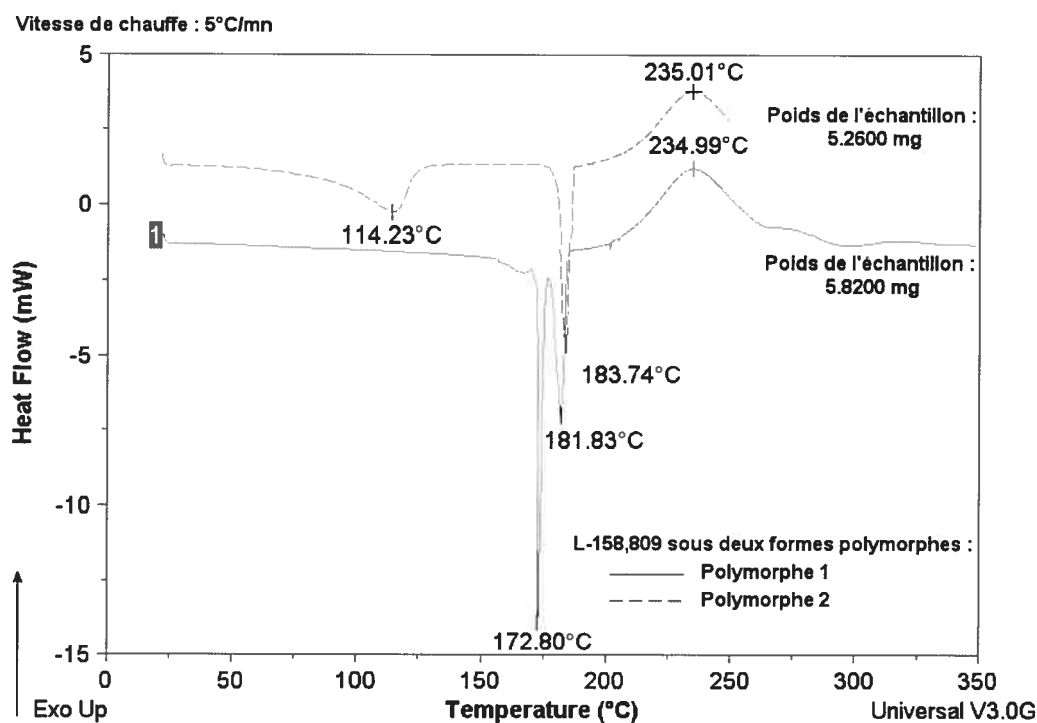


Figure IV - 2.3-26 Thermogrammes de DSC des formes polymorphiques et de la forme hydratée de L-158,809

Les Figures IV – 2.3-26, IV – 2.3-27 et IV – 2.3-28 montrent des thermogrammes de DSC de L-158,809, qui exhibent deux formes polymorphiques et une forme hydratée.

Le thermogramme de la Figure IV – 2.3-27 présente deux pics de fusion bien séparés, dont les maximums de température sont 172,80 °C et 181,83 °C, avec une chaleur totale de fusion associée aux pics de 116,9 J/g. Cet échantillon se présente donc sous deux formes

polymorphiques, dont la première a un pic de fusion à 172,80 °C et la seconde à 181,83 °C. Les résultats de la Figure IV – 2.3-28 vont permettre de déduire la chaleur de fusion associée à chacun des deux polymorphes.

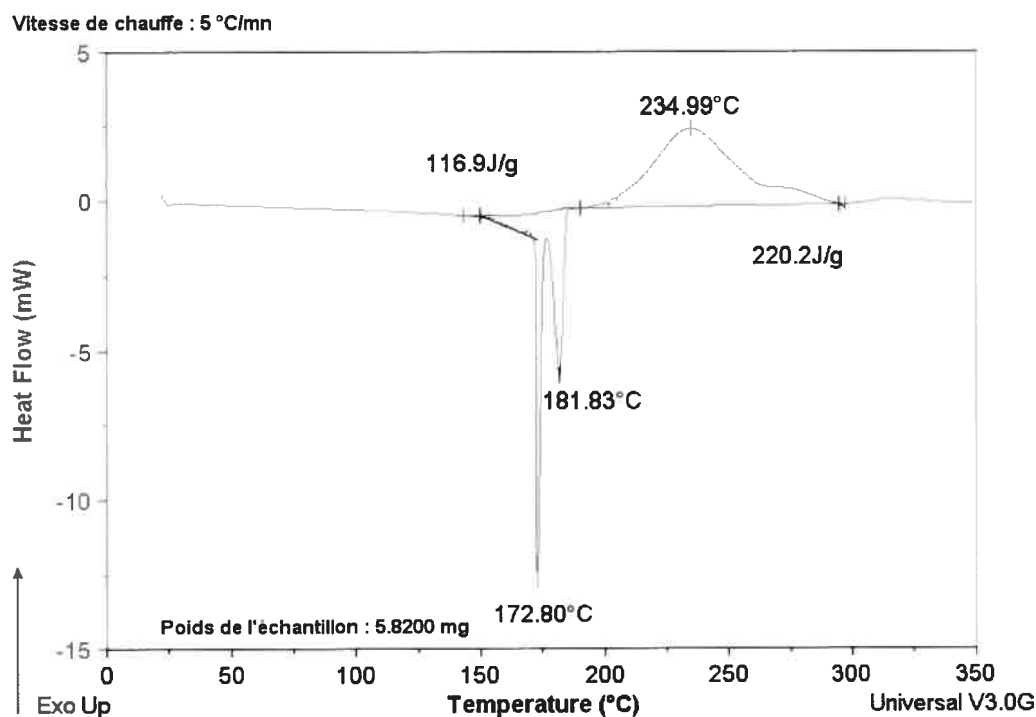


Figure IV - 2.3-27 Thermogrammes de DSC des polymorphes de L-158,809

Le thermogramme de la Figure IV – 2.3-28 présente un pic de fusion, dont le maximum de chaleur est 183,74 °C. La chaleur de fusion associée à ce pic est 54,13 J/g. De plus, le tracé exhibe aussi un large pic endothermique dont le maximum s'établit à 114,23 °C et dont la chaleur de fusion est 100,3 J/g. Ce large pic endothermique laisse à penser que cet échantillon pourrait contenir une forme hydratée du L-158,809, dans la mesure où ce large pic débute à 48 °C et présente un maximum autour de 100 °C.

De plus, comme ce thermogramme conserve la présence d'une seule forme polymorphe associée au pic de fusion à 183,74 °C, avec une chaleur de fusion de 54,13 J/g, il est possible de déduire la valeur de la chaleur de fusion du pic endothermique à 172,80 °C de l'autre forme polymorphique, de la Figure IV – 2.3-27. Cette valeur est 62,77 J/g (valeur obtenue en soustrayant 54,13 à 116,9 J/g).

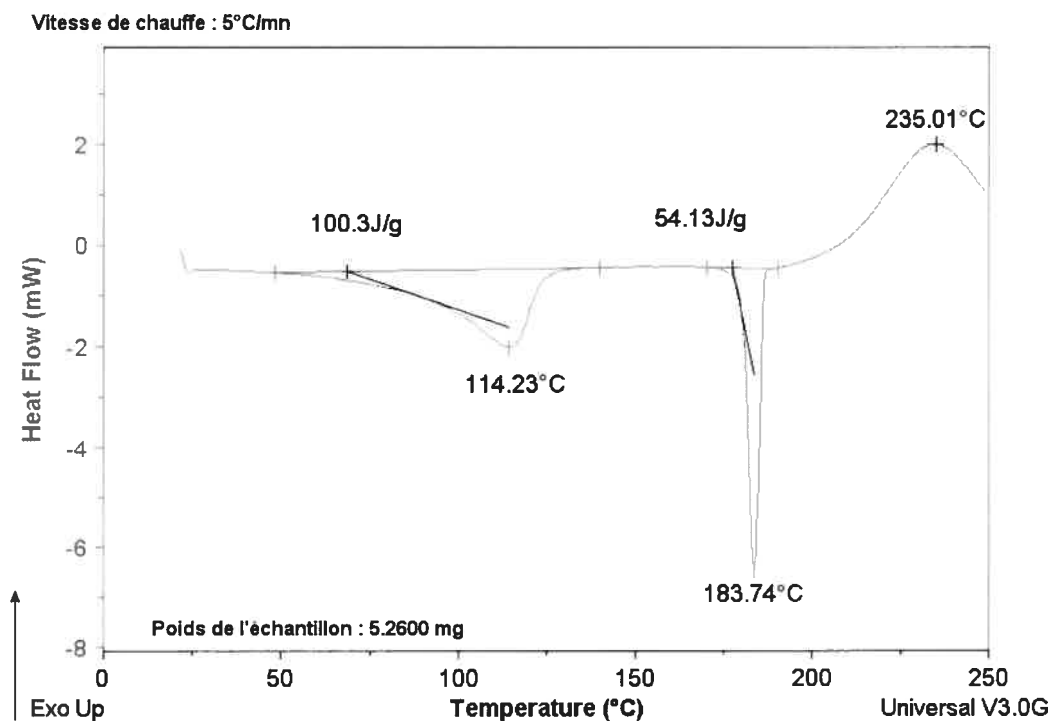


Figure IV - 2.3-28 Thermogramme de DSC de la forme hydrate de L-158,809

Les thermogrammes des trois figures montrent aussi que les polymorphes de L-158,809 peuvent se recristalliser au fur et à mesure que la température s'élève. La phase de recristallisation présente une température maximale autour de 235 °C et possède une chaleur de fusion de 220,2 J/g.

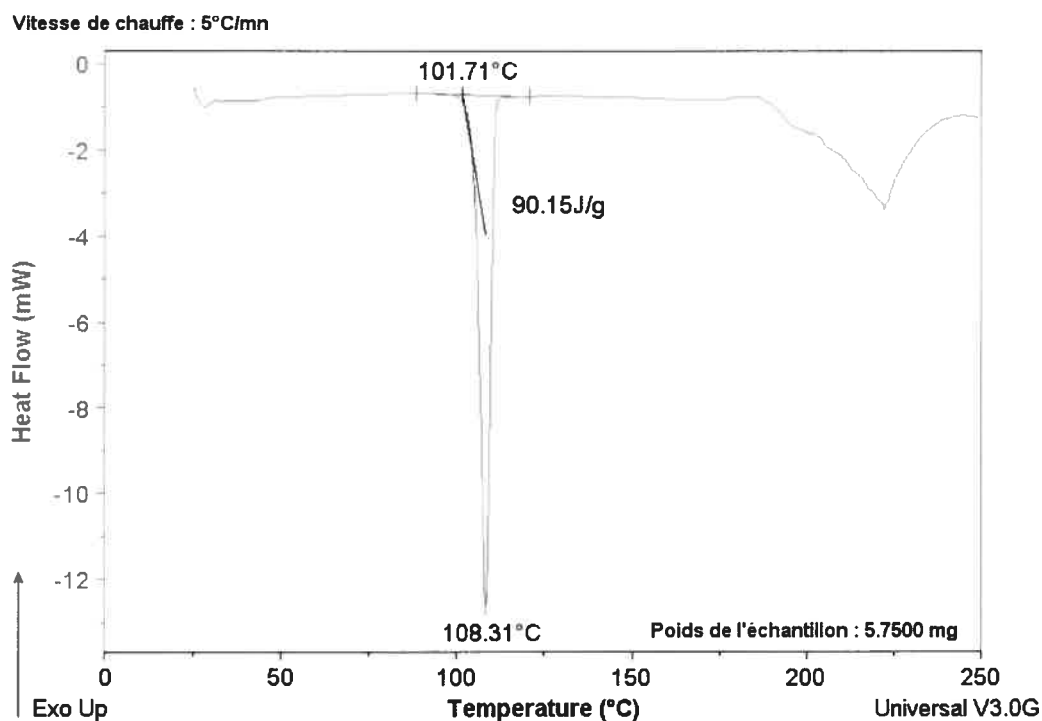


Figure IV - 2.3-29 Thermogramme de DSC du Captopril

Le thermogramme de DSC du Captopril, exhibé dans la Figure IV - 2.3-29 montre que le Captopril a un pic de fusion dont le maximum s'établit à 108,31 °C et dont la chaleur de fusion est 90,15 J/g. La température de fusion concorde avec celle présentée dans le Merck Index qui souligne que le Captopril possède un point de fusion à 106 °C. Il est difficile de pouvoir associer, avec assurance, l'évolution endothermique, noté à la fin du tracé du thermogramme, à un pic de fusion car il pourrait correspondre aussi bien, soit à un artéfact, soit à un rééquilibrage thermique du système.

La Figure IV -2.3-30 présentent les thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec différentes teneurs en L-158,809. Elle indique que le L-158,809 microencapsulé dans les microsphères de PLA ne s'y trouve pas sous forme cristalline mais

plutôt sous forme d'une dispersion moléculaire car l'analyse des thermogrammes indique l'absence d'un pic de fusion du L-158,809.

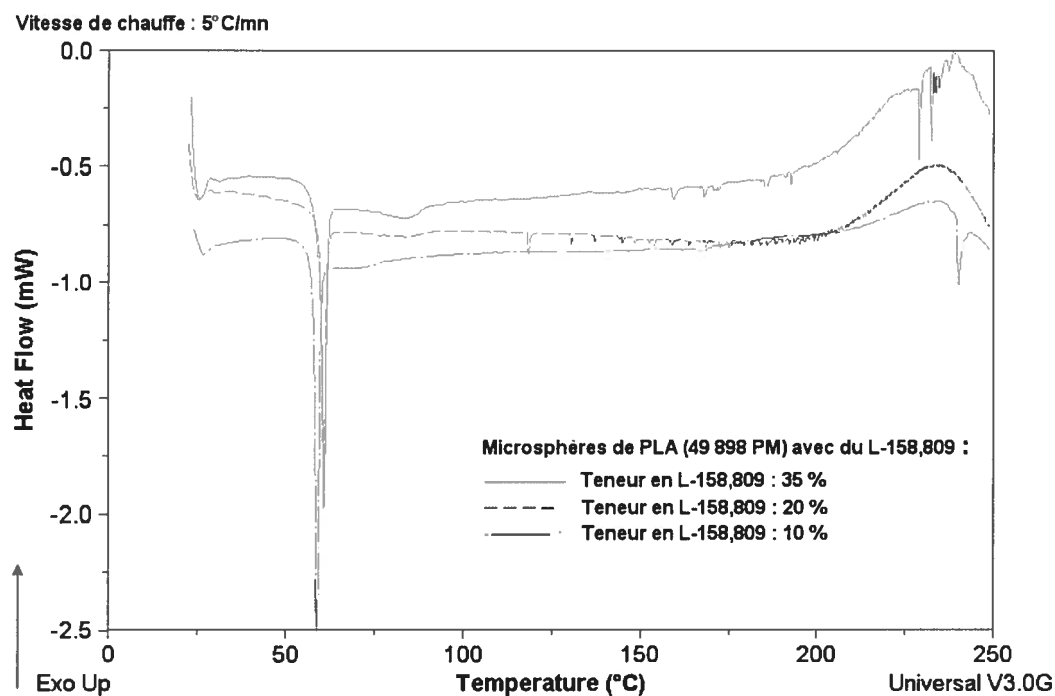


Figure IV - 2.3-30 Thermogrammes de DSC de microsphères de PLA (49 898 PM) avec des teneurs croissantes (10 %, 20 %, 35 %) en L158,809

Les résultats de l'analyse des thermogrammes sont résumés dans le Tableau IV – 2.3-2. Ils montrent qu'il ne semble pas y avoir de corrélations significatives entre les valeurs de la T_g et de la capacité calorifique versus les différentes teneurs en L-158,809. Également, il ne semble pas y avoir de corrélations significatives entre les valeurs des caractéristiques du pic endothermique de relaxation enthalpique (température et chaleur de fusion) et les différentes teneurs en L-158,809.

Microsphères de PLA 49 898 PM Teneur en L-158,809 (%)	T _g (°C)	Capacité calorifique (J/g/°C)	Pic endothermique de relaxation enthalpique	
			Température (°C)	Chaleur de fusion (J/g)
10	55.59	0.3383	58.65	5.831
20	57.53	0.3989	60.49	4.448
35	56.26	0.3112	60.61	4.534

Tableau IV - 2.3-2 Résultats des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA avec des teneurs croissantes (10 %, 20 % 35 %) en L-158,809.

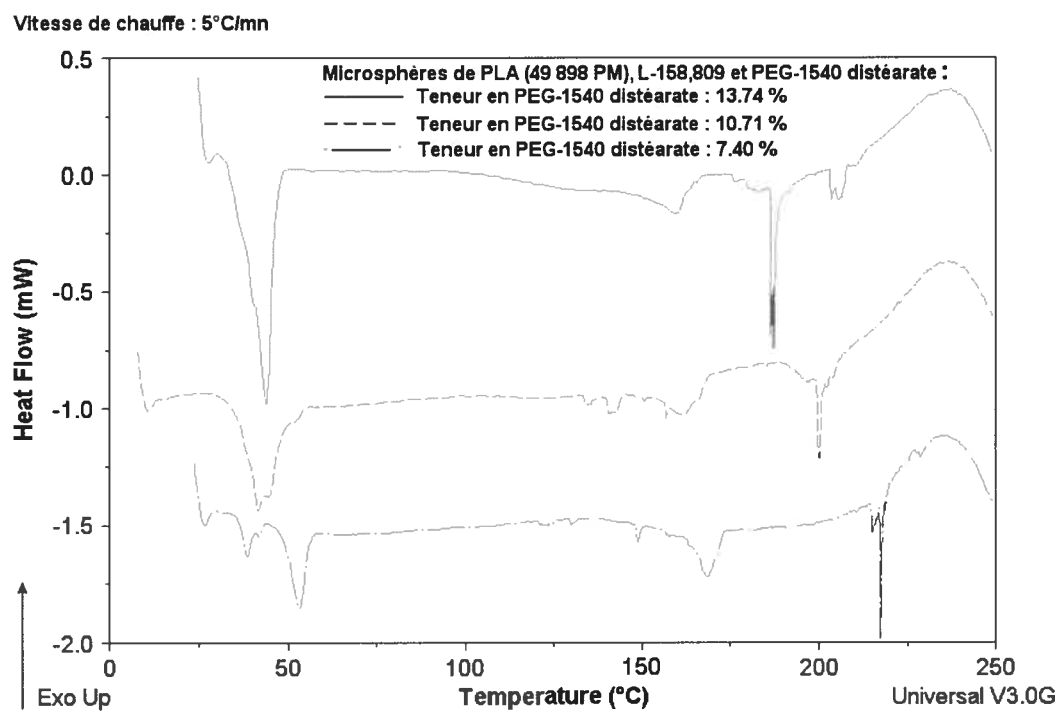


Figure IV - 2.3-31 Thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs en PLA sur L-158,809 égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 %, 10,71 %, 13,74 %) en PEG-1540 distéarate.

La Figure IV – 2.3-31 montre les thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en L-158,809 et des teneurs croissantes en PEG-1540 distéarate.

Le Tableau IV – 2.3-3 qui en résume toutes les caractéristiques, montre l'existence d'un pic endothermique marqué, dont le maximum semble diminuer lorsque la teneur en PEG-1540 distéarate augmente dans la formulation.

Microsphères de PLA avec L-158,809 (le ratio des teneurs PLA sur L-158,80 est 4)	T _g (°C)	Capacité calorifique (J/g/°C)	Pics endothermiques	
			Température (°C)	Chaleur de fusion (J/g)
7.40	détermination incertaine	détermination incertaine	38.78	1.026
			53.44	3.089
			148.80	0.172
			168.55	3.641
			217.36	1.746
10.71	33.24	0.1239	42.00	8.522
			141.09	0.861
			161.93	3.263
			200.15	4.516
13.74	33.05	0.1443	44.08	13.78
			159.09	7.954
			187.23	3.659
			205.86	1.094

Tableau IV - 2.3-3 Résultats des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs de PLA sur L-158,809 égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 % , 10,71 % , 13,74 %) en PEG-1540 distéarate.

Ce pic endothermique n'est pas un pic de fusion du L-158,809. En effet, d'une part, il a été montré précédemment que ce dernier n'est pas à l'état cristallin dans les

microsphères de PLA et d'autre part, comme la teneur en L-158,809 reste invariable dans les trois formulations, s'il s'agissait d'un pic de fusion d'un polymorphe de L-158,809, il devrait apparaître dans le thermogramme de la formulation à 7,40 % de PEG-1540 distéarate, or il ne s'y trouve pas. En fait, il n'y a aucun pic de fusion, appartenant au L-158,809, qui soit exhibé dans la Figure IV – 2.3-31. Par conséquent, il est très intéressant de constater que le L-158,809 microencapsulé demeure non pas à l'état cristallin mais dispersé à l'état moléculaire dans des microsphères contenant du PEG-1540 distéarate, même lorsque la teneur en PEG-1540 distéarate croît de 7,40 % à 13,74 %. Il existe un large pic endothermique, qui est présent dans les trois formulations de microsphères avec 7,40 % , 10,71 % et 13,74 % de PEG-1540 distéarate et son maximum de température est respectivement 168,55 °C , 161,93 °C et 159,09 °C. Par ailleurs, la Figure IV – 2.3-31 et le Tableau IV – 2.3-3 indiquent que le pic de fusion du PEG-1540 distéarate visible dans la formulation avec 7,40 % de PEG-1540 distéarate semble fusionner avec le pic endothermique de relaxation enthalpique lorsque la teneur en PEG-1540 distéarate augmente. De plus, les valeurs de la Tg et de la variation de la capacité calorifique semblent demeurer stables dans les formulations avec 7,40 % et 10,71 % de PEG-1540 distéarate. Toutefois, lorsque la teneur en PEG-1540 distéarate est 7,40 %, la Tg et la variation de la capacité calorifique sont difficiles à déterminer avec assurance.

La Figure IV – 2.3-32 montre les thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (10 %, 20 %, 35 %) en Captopril. Le Tableau IV – 2.3-4 en résume les caractéristiques. Les résultats obtenus de cette figure et de ce tableau ne montrent pas la présence du pic de fusion du Captopril. Par conséquent, le Captopril microencapsulé dans des microsphères de PLA, ne s'y trouve pas à l'état cristallin mais dispersé de manière moléculaire. Les thermogrammes de DSC de ces microsphères montrent la présence d'une transition vitreuse. De plus, il faut aussi noter la présence d'un pic endothermique de relaxation enthalpique dans tous les thermogrammes. Le tracé associé à la teneur en Captopril de 10 %, exhibe un large pic endothermique, dont le maximum est à 93,61 °C et dont la chaleur de fusion est 3,634 J/g.

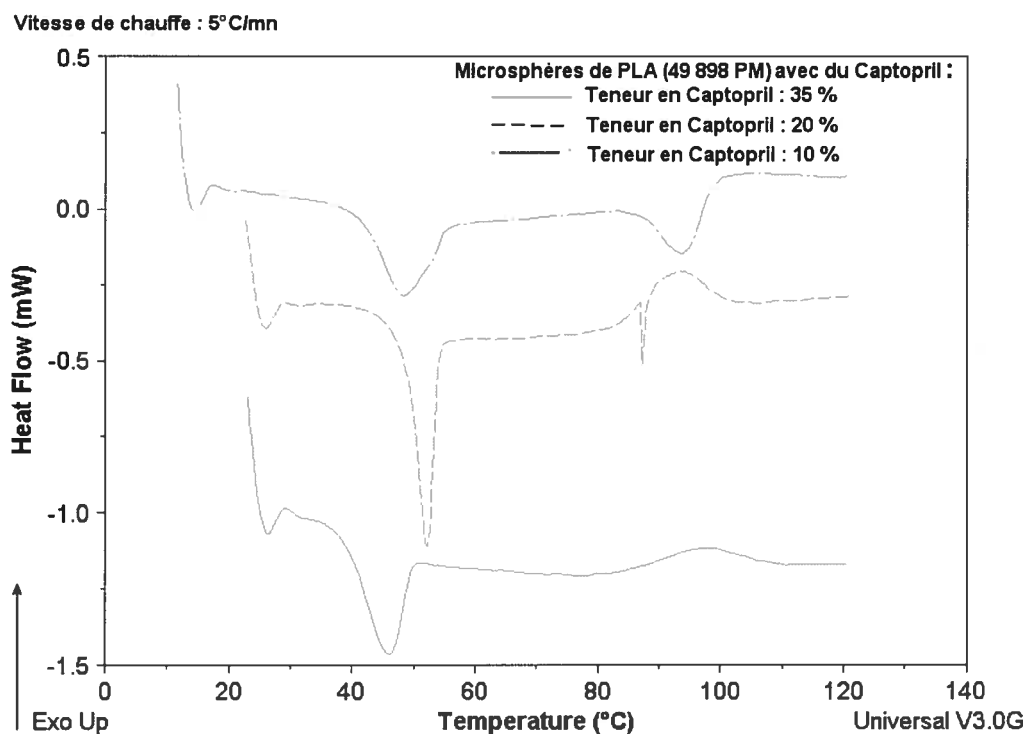


Figure IV - 2.3-32 Thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (10 %, 20 %, 35 %) en Captopril.

Microsphères de PLA 49 898 PM	T _g (°C)	Capacité calorifique (J/g/°C)	Pic endothermique de relaxation enthalpique	
			Température (°C)	Chaleur de fusion (J/g)
Teneur en Captopril (%)				
10	38.51	0.3461	46.14	3.679
20	45.74	0.2423	52.22	4.681
35	40.80	0.1550	48.21	3.645

Tableau IV - 2.3-4 Résultats des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA avec des teneurs croissantes (10 %, 20 % 35 %) en Captopril.

La présence d'un tel pic signale que, dans cette formulation de microsphères nébulisées, il existe une composante cristalline non négligeable parmi les régions amorphes des chaînes polymériques, et qui est susceptible d'être fondue. Par contre, lorsque les teneurs en Captopril sont 20 % et 35 %, les thermogrammes semblent exhiber plutôt un large pic exothermique, signe de la survenue d'une recristallisation lors du chauffage. Ainsi, lorsque la teneur en Captopril est 20 %, la recristallisation présente un maximum à 97,24 °C avec une chaleur de fusion de 2,415 J/g. Lorsque cette teneur est 35 %, la recristallisation possède un maximum à 92,59 °C avec une chaleur de fusion de 3,425 J/g. Par conséquent, lorsque la température augmente progressivement au-delà de la transition vitreuse, un processus de recristallisation se produit parce que les chaînes polymériques parviennent à s'arranger de manière ordonnée dans une région du polymère pour y établir, en ce lieu, une zone très cristalline. Enfin, puisque la formation de l'état cristallin réclame de l'énergie au milieu extérieur, le processus de recristallisation ne peut être qu'exothermique.

La Figure IV – 2.3-33 montre des thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs en PLA sur Captopril égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 % , 13,74 %) en PEG-1540 distéarate. La formulation avec 13,74 % de PEG-1540 distéarate comporte une transition vitreuse avec une T_g à 29,50 °C, associée à une petite variation de la capacité calorifique de 0,02713 J/g, mais pas de pic endothermique de relaxation enthalpique. Toutefois, il y a la présence d'un large pic endothermique dont le maximum est à 77,13 °C et dont la chaleur de fusion est 3,735 J/g. La variation de la capacité calorifique qui est faible, est la signature d'un échantillon qui est très cristallin. La présence du pic endothermique abonde dans le sens de cette observation puisqu'elle signale une composante cristalline, susceptible à la fusion avec la montée de la température. Il semble que la présence d'une forte teneur en PEG-1540 distéarate dans le cas d'une formulation de microsphères de PLA avec Captopril ait contribué à augmenter la cristallinité dans ces systèmes polymériques.

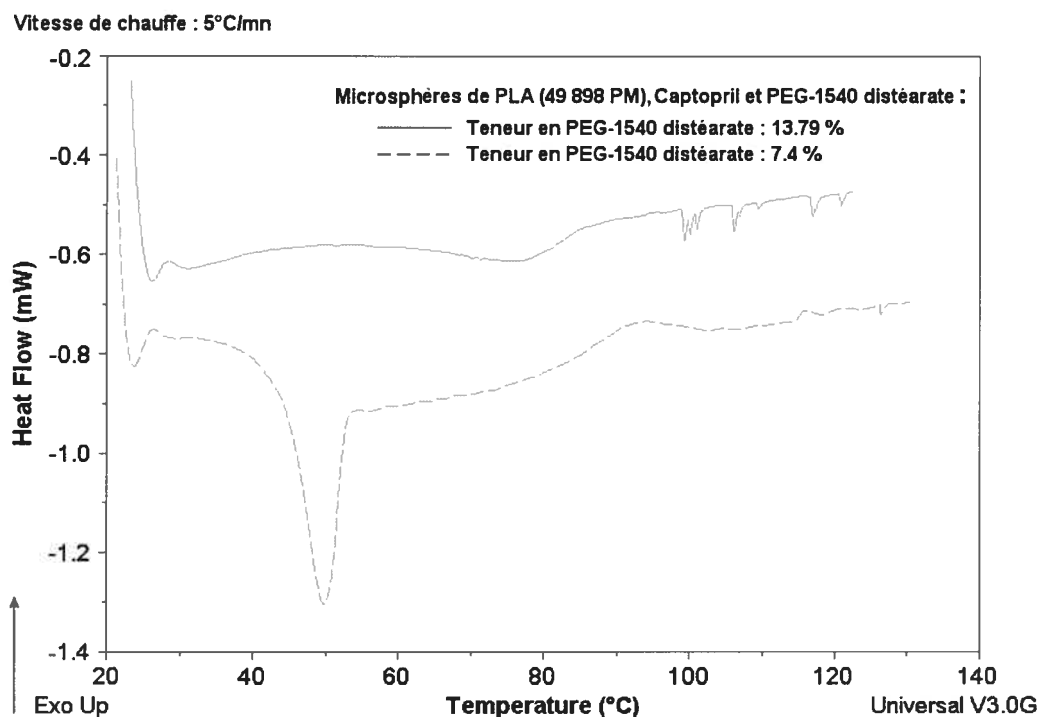


Figure IV - 2.3-33 Thermogrammes de DSC des microsphères de PLA 49 898 PM avec un ratio des teneurs en PLA sur Captopril égal à 4 et des teneurs croissantes (7,40 %, 13,74 %) en PEG-1540 distéarate.

Par ailleurs, la formulation avec 7,40 % de PEG-1540 distéarate souligne l'existence d'un pic endothermique de relaxation enthalpique dont le maximum est à 49,75 °C avec une chaleur de fusion de 3,596 J/g. Cette formulation possède une transition vitreuse dont la T_g s'établit à 42,49 °C et qui est associée à une variation de la capacité calorifique de 0,2904 J/g

Enfin, tous les tracés ne semblent pas indiquer la présence marquée du pic de fusion du Captopril, à 108 °C. Par conséquent, le Captopril microencapsulé dans ces formulations, s'y trouve non pas à l'état cristallin mais à l'état de dispersion moléculaire.

IV - 2.4 Application de la spectroscopie Raman à la caractérisation chimique de la surface des microsphères.

Les analyses enthalpiques différentielles ont montré que les principes actifs, le L-158,809 et le Captopril, se trouvent microencapsulés, dans les microsphères, non pas à l'état cristallin mais à l'état de dispersion moléculaire, puisque leur pic de fusion est absent des thermogrammes de DSC. Dès lors, il devient légitime de vérifier si la surface des microsphères est exempte, ou non, de molécules de principes actifs. Pour les caractérisations par spectroscopie Raman, les trois modèles de principes actifs utilisés étaient le L-158,809, le Captopril et la dexaméthasone. Les deux polymères, servant de matrices constitutives, étaient le PLA et le PLGA. Enfin, un autre excipient important, présent dans les microsphères, était le PEG-1540 distéarate.

IV - 2.4.1 Caractérisations Raman des principes actifs

Les caractérisations Raman des principes actifs utilisés ont permis d'une part de vérifier la possibilité d'obtenir des spectres Raman de ces substances et d'autre part de pouvoir identifier leurs principaux pics majeurs. Ainsi, dans l'Annexe VII-E sont présentés les spectres Raman des principes actifs utilisés, L-158,809 (Annexe E - VII-5.1), Captopril (Annexe E - VII-5.2) et dexaméthasone (Annexe E - VII-5.3) ainsi que leurs principaux pics.

IV - 2.4.2 Caractérisations Raman des excipients

Comme précédemment, les caractérisations Raman des excipients ont permis d'une part de vérifier la possibilité d'obtenir des spectres Raman de ces substances et d'autre part de pouvoir identifier leurs principaux pics majeurs (Annexe VII-F). Comme le spectre

Raman du PEG-1540 distéarate démontrait la présence de la fluorescence de l'excipient (Annexe F - VII-6.1), un retrait de la fluorescence a été appliqué dans le but de mieux préciser la position des principaux pics du produit (Annexe F - VII-6.2). Dans le même sens, les spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM et des microsphères de PLGA 48 000 PM démontraient d'une part, que les deux spectres obtenus n'étaient pas identiques et d'autre part, la présence de la fluorescence des échantillons (Annexe F - VII-6.3). C'est pourquoi, la position des principaux pics des microsphères de PLA 49 898 PM et des microsphères de PLGA 48 000 PM a été déterminée respectivement à partir du spectre Raman des microsphères de PLA 49 898 PM, auquel un retrait de la fluorescence du PLA a été appliqué (Annexe F - VII-6.4) et à partir du spectre Raman des microsphères de PLGA 48 000 PM, auquel un retrait de la fluorescence du PLGA a été appliqué (Annexe F - VII-6.5).

Puisque la spectroscopie Raman est sensible à l'environnement chimique de la substance étudiée, il était intéressant de savoir si des microsphères d'un même polymère, différant seulement par la masse moléculaire du polymère allaient présenter des spectres Raman identiques. La Figure IV – 2.4-1 montre trois spectres Raman de microsphères de trois PLA, de masses moléculaires différentes : 49 898 PM, 66 815 PM et 95 248 PM. Elle illustre que les tracés spectraux des trois PLA semblent identiques quant à la position de tous leurs pics Raman. C'est pourquoi, il pourrait être plus difficile de différencier différents microsphères de PLA, de poids moléculaires différents, au moyen de la spectroscopie Raman. De plus, il y a beaucoup de fluorescence dans les échantillons de microsphères de PLA 49 898 PM et de microsphères de PLA 66 815, comparativement à ceux de PLA 95 248 PM. La source de cette fluorescence n'est pas clairement élucidée car elle pourrait être par exemple liée, soit à la présence d'impuretés incluses, soit à la nature de l'échantillon lui-même.

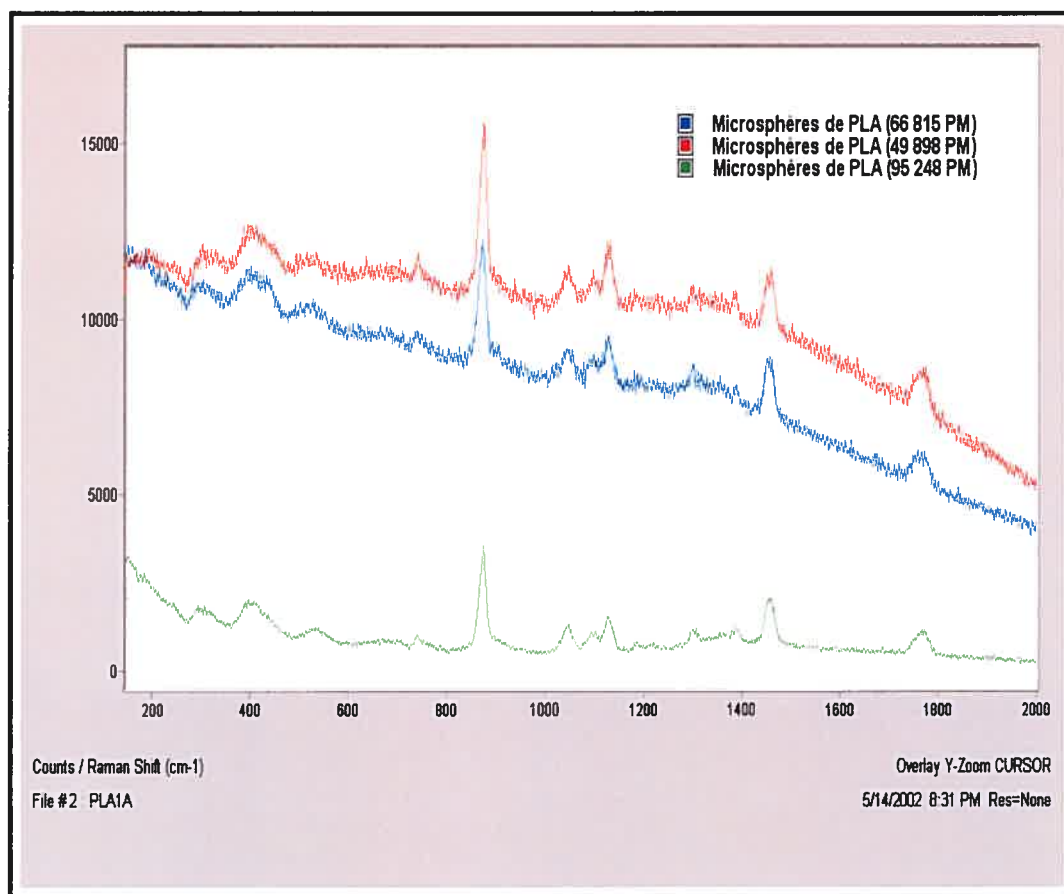


Figure IV - 2.4-1 Spectres Raman de microsphères de trois PLA, de trois masses moléculaires différentes (49 898 PM, 66 815 PM et 95 248 PM).

IV - 2.4.3 Application de la spectroscopie Raman dans l'évaluation de la présence de principes actifs à la surface de microsphères nébulisées.

Évaluer la surface des microsphères et pouvoir y déterminer avec assurance la présence de principes actifs pourrait constituer une autre voie intéressante pour caractériser la qualité d'une nébulisation.

La Figure IV – 2.4-2 montre les spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes en L-158,809. L'observation des tracés permet de dire qu'il est possible de détecter des pics du PLA, en particulier le pic 875 et le pic 1767. Parmi les pics du L-158,809, détectés à la surface des microsphères avec le principe actif, seulement quatre pics sont clairement identifiés : le pic 541, le pic 810, le pic 1507 et le pic 1616. Les spectres indiquent que ces quatre pics sont plus marqués lorsque les teneurs en L-158,809 sont élevées. Par ailleurs, il faut noter le déplacement du pic 541, détecté à la surface des microsphères avec L-158,809, qui correspond en fait au pic 538, détecté sur du L-158,809 à l'état cristallin. Il semble donc possible d'appliquer la spectroscopie Raman pour contrôler qualitativement la présence de L-158,809 à la surface des microsphères de PLA nébulisées.

La Figure IV – 2.4-3 montrent des spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en L-158,809 (ratio des teneurs de PLA sur L-158,809 égale à 4) mais avec des teneurs croissantes (3.84 %, 7.40 %, 10.71 %, 13.79 %) en PEG-1540 distéarate. Il est possible de détecter les deux pics du PLA, c'est à dire le pic 875 et le pic 1767, sur toutes les microsphères. Par contre, il n'a pas été possible de détecter des pics associés au PEG-1540 distéarate car les signaux caractéristiques du PEG-1540 distéarate sont masqués par, soit la présence des signaux du L-158,809 ou soit la présence des signaux du PLA. Les quatre pics du L-158,809 (le pic 541, le pic 810, le pic 1507 et le pic 1616) sont également clairement identifiés quelles que soient les teneurs en PEG-1540 distéarate.

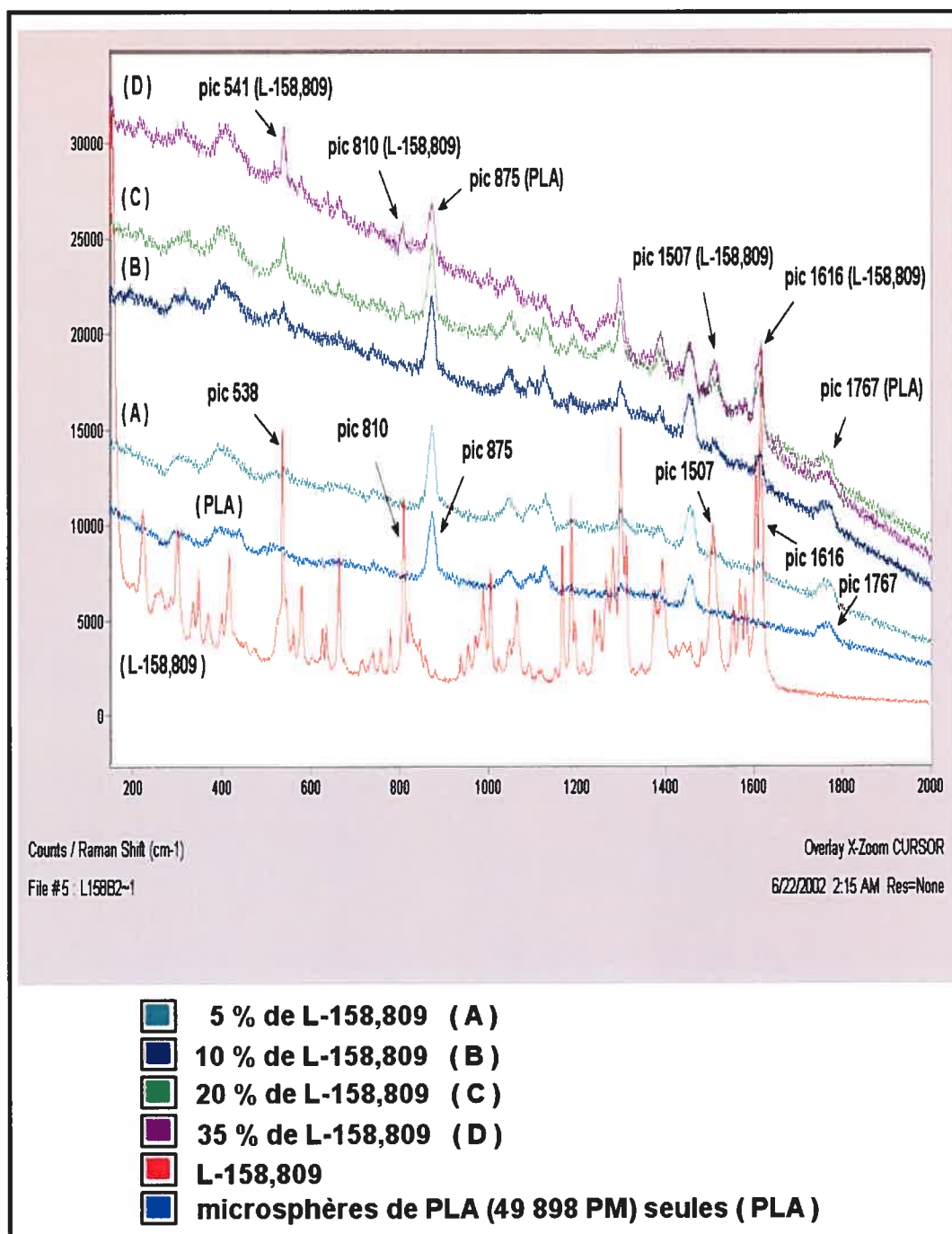


Figure IV - 2.4-2 Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en L-158,809.

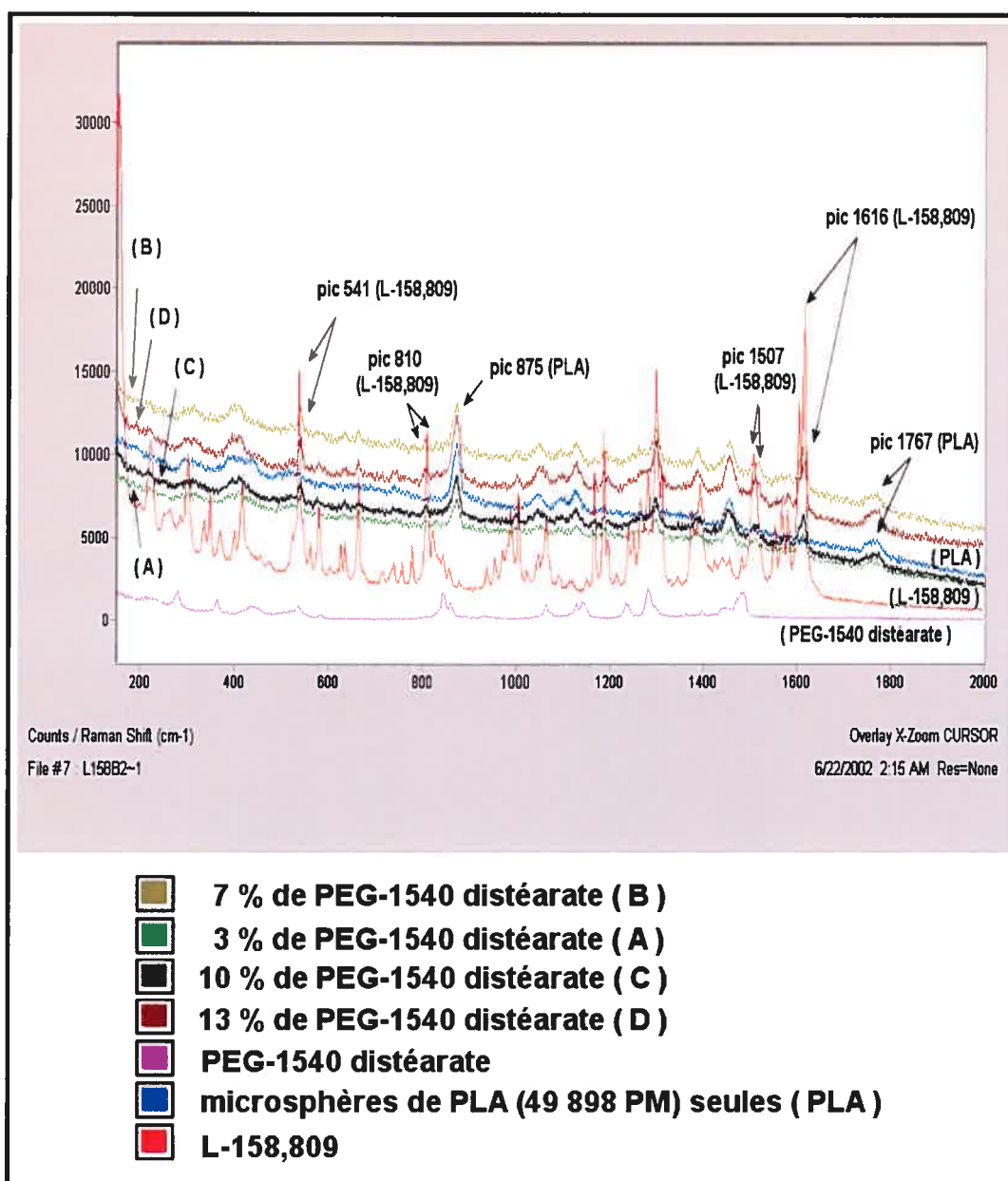


Figure IV - 2.4-3 Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en L-158,809 (ratio des teneurs de PLA sur L-158,809 égale à 4) mais avec des teneurs croissantes (3,84 % ; 7,40 % ; 10,71 % ; 13,79 %) en PEG-1540 distéarate.

La situation de la Figure IV – 2.4-4 est autre. Dans ce cas, il s'agit de microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en Captopril (ratio des teneurs de PLA sur Captopril égale à 4) mais avec deux teneurs, 7,40 % et 13,79 %, en PEG-1540 distéarate. Il bon de noter qu'un ratio des teneurs de PLA sur Captopril égale à quatre correspond en fait à une teneur de 20 % de Captopril dans chaque microsphère. Il est difficile d'attribuer et de corréliser avec certitude des pics contenus dans les spectres des microsphères, à ceux du Captopril. Dans le cas du spectre des microsphères avec 7 % de PEG-1540 distéarate, malgré le fait que tous les pics semblent être d'amplitude plus accentuée, les attributions concernent les signaux associés au PLA. Également, il n'a pas été possible de détecter des pics associés au PEG-1540 distéarate car les signaux caractéristiques du PEG-1540 distéarate sont masqués par soit la présence des signaux du Captopril ou soit la présence des signaux du PLA.

Le problème de savoir si la présence de PEG-1540 distéarate contribue à masquer ou non des pics du Captopril, trouve sa solution dans la Figure IV – 2.4-5. En effet, la Figure IV – 2.4-5 montre des spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en Captopril. Sur ces spectres, lorsque la teneur en Captopril est 35 %, trois pics, clairement identifiés, le pic 663, le pic 800 et le pic 1615, associés au Captopril, peuvent être détectés. En dessous de cette teneur, il n'a pas été possible d'attribuer avec certitude des signaux du Captopril, en particulier, lorsque la teneur est 20 % de Captopril. Par ailleurs, il faut noter le déplacement du pic 800, détecté à la surface des microsphères avec 35 % de Captopril, qui correspond en fait au pic 806 détecté sur du Captopril pur.

En conséquence, l'absence des pics Raman, associés au Captopril, des spectres des microsphères de la Figure IV – 2.4-4 n'est pas corrélée avec la présence de PEG-1540 distéarate mais plutôt au fait que 20 % de Captopril dans des microsphères de PLA ne permettent pas de détecter, avec assurance, des pics du Captopril.

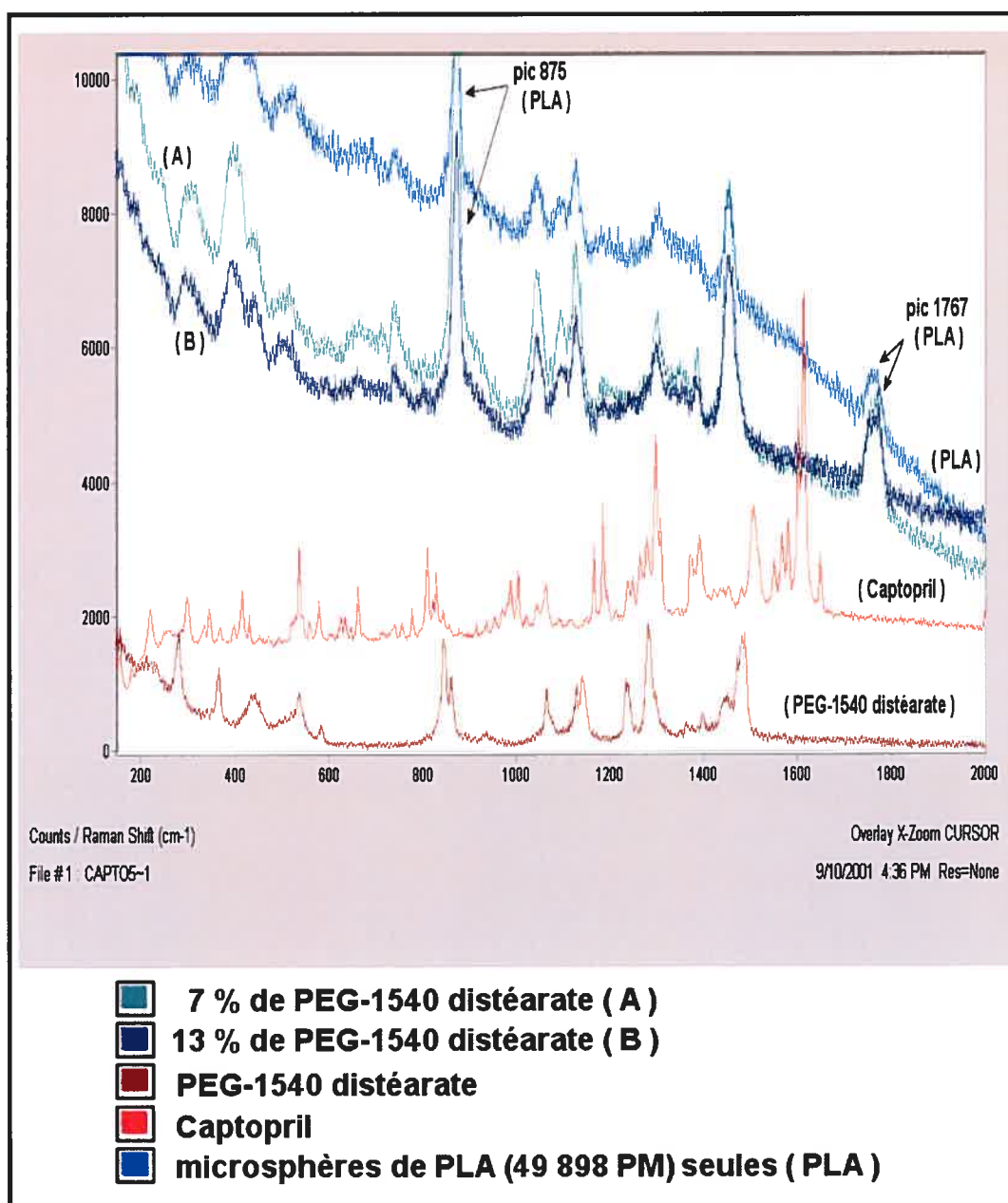


Figure IV - 2.4-4 Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec une teneur constante en Captopril (ratio des teneurs de PLA sur Captopril égale à 4) mais avec deux teneurs, 7,40 % et 13,79 %, en PEG-1540 distéarate.

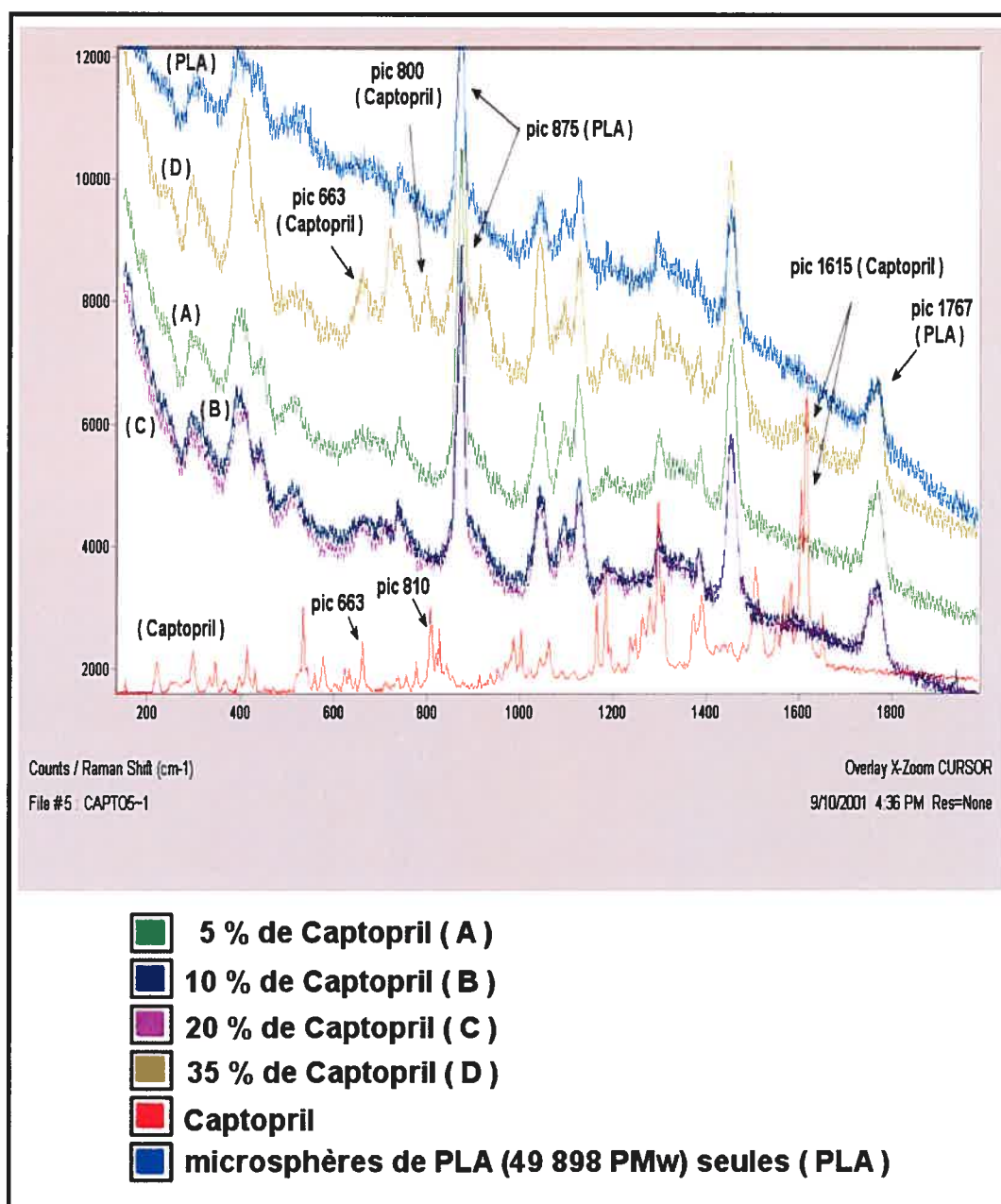


Figure IV - 2.4-5 Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en Captopril.

Le dernier exemple de situation est représenté par la dexaméthasone microencapsulée dans un autre modèle de polymère, comme le PLGA. La Figure IV – 2.4-6 présente des spectres Raman des microsphères de PLGA RG504 avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en dexaméthasone.

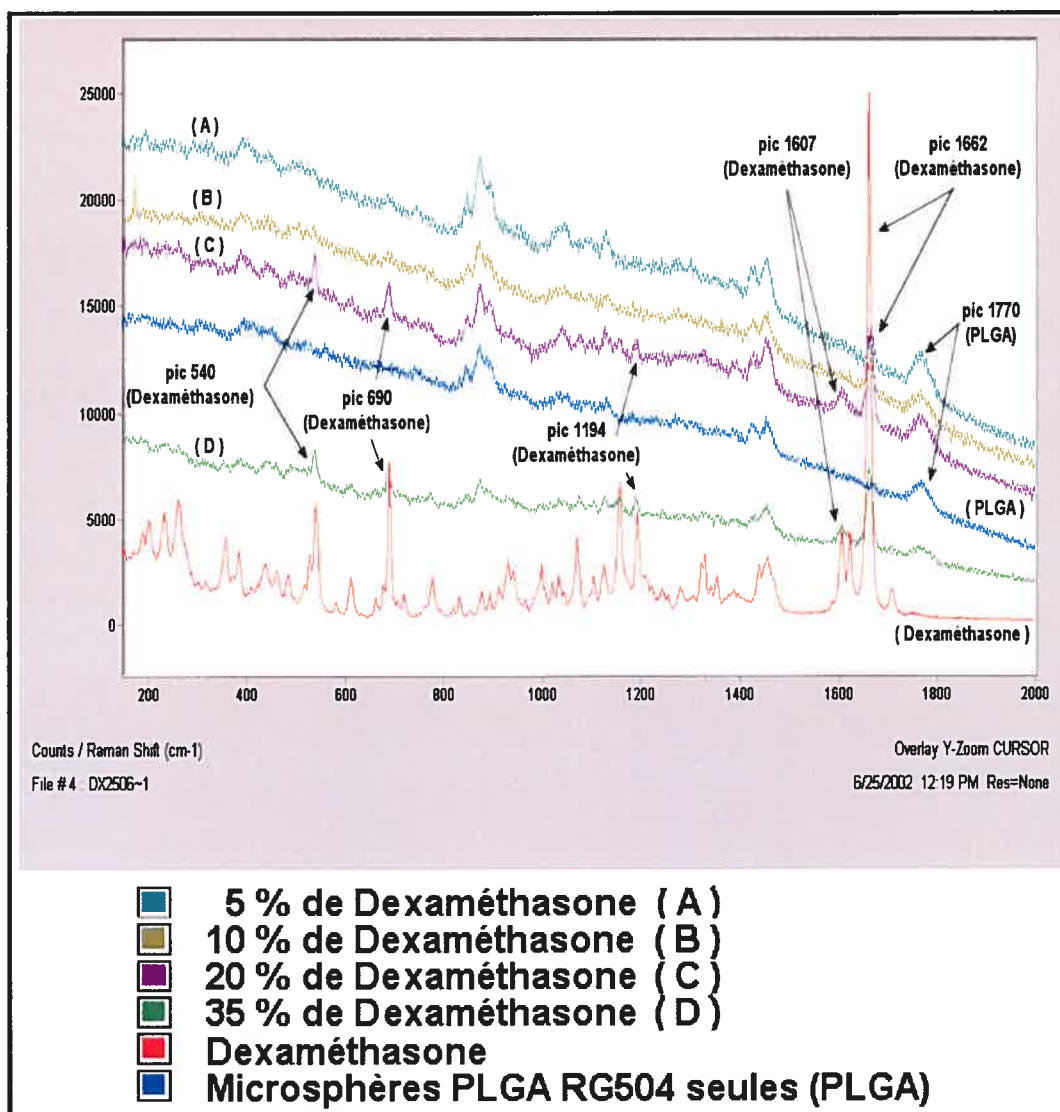


Figure IV - 2.4-6 Spectres Raman des microsphères de PLGA RG504 avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 %, 35 %) en dexaméthasone.

Les pics Raman du dexaméthasone à la surface des microsphères de PLGA clairement identifiés sont notamment le pic 540, le pic 690, le pic 1194, le pic 1607 et le pic 1662. Un seul pic associé au PLGA est clairement identifié. Il s'agit du pic 1770. De plus, en dessous de 20 % de dexaméthasone, la plupart de ses pics caractéristiques semblent absents des spectres. Néanmoins, il est intéressant de noter que le pic 1662 du principe actif, reste visible sur tous les tracés.

En conséquence directe à ces résultats, la spectroscopie Raman pourrait constituer un outil de choix à l'évaluation de la présence des principes actifs à la surface des microsphères nébulisées. Cette méthodologie pratique demeure doublement intéressante car d'une part, elle ne nécessite pas la dénaturation des échantillons de microsphères et d'autre part, elle est fiable.

IV - 2.4.4 Application de la spectroscopie Raman à l'évaluation de l'uniformité en principes actifs à la surface des microsphères de PLA et PLGA nébulisées.

L'observation des Figures IV – 2.4-2, IV – 2.4-3, IV – 2.4-5 et IV – 2.4-6 amène à penser qu'il pourrait y avoir une relation entre la surface des pics de principe actif et leur teneur au sein des microsphères nébulisées. Pour vérifier cette possibilité, une méthodologie de choix a été développée. En effet, afin de minimiser au mieux tous les biais expérimentaux possibles, calculer le rapport moyen des surfaces des pics de principe actif (L-158,809, Captopril ou dexaméthasone) sur les surfaces des pics de la matrice polymérique (PLA ou PLGA) constitue une méthodologie plus stable, à la manière des dosages analytiques avec standard interne. De plus, le calcul du coefficient de variation (C.V.) a été calculé pour chaque rapport moyen des surfaces des pics. Cette approche par le C.V. offre l'avantage d'établir une variabilité dans une relative perspective de la magnitude des mesures et permet aussi une comparaison de la variabilité de différentes mesures. La démarche entreprise a comporté plusieurs étapes.

IV - 2.4.4.1 Détermination de la fiabilité des signaux Raman enregistrés.

Bien que l'analyseur spectroscopique Raman soit un système très fiable et très précis selon le manufacturier, une étude a été néanmoins entreprise afin de valider les valeurs enregistrées à partir des signaux Raman détectés à la surface des microsphères.

À cette fin, le tableau IV – 2.4-1 montrent les résultats obtenus après six enregistrements consécutifs de signaux Raman détectés, lorsque le laser reste positionné à la même position, sur le même échantillon pour chacune des catégories de microsphères de PLA 49 898 PM avec des teneurs croissantes (5 %, 10 %, 20 % et 35 %) de L-158,809.

Les résultats obtenus montrent que les coefficients de variations (C.V.) des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur ceux du PLA sont inférieurs à 3 %, signifiant que n'importe quelle déviation standard est inférieure au trois centième de la moyenne du ratio correspondant. En conséquence, il est possible de considérer que la variabilité d'un signal mesuré six fois de suite à la même position sur l'échantillon reste faible. Par conséquent, mesurer un signal Raman une fois est amplement suffisant et il n'est plus nécessaire de le mesurer six fois de suite à la même position sur les microsphères.

Teneur en L-158,809 microencapsulé	Ratios des surfaces des pics	Moyenne des ratios	Erreur Type	Coefficient de variation (%)
5 %	pic 541 / pic 875	0.059	0.0003	1.28
	pic 810 / pic 875	0.058	0.0004	1.84
	pic 1507 / pic 875	0.076	0.0007	2.48
	pic 1616 / pic 875	0.186	0.002	1.98
	pic 541 / pic 1767	0.119	0.001	2.18
	pic 810 / pic 1767	0.117	0.001	2.69
	pic 1507 / pic 1767	0.154	0.002	2.63
	pic 1616 / pic 1767	0.376	0.004	2.44
	pic 875 / pic 1767	2.023	0.018	2.18
	pic 1767 / pic 875	0.494	0.004	2.17
10 %	pic 541 / pic 875	0.107	0.001	2.53
	pic 810 / pic 875	0.057	0.0006	2.83
	pic 1507 / pic 875	0.145	0.0007	1.18
	pic 1616 / pic 875	0.351	0.003	1.92
	pic 541 / pic 1767	0.222	0.002	1.79
	pic 810 / pic 1767	0.118	0.001	2.61
	pic 1507 / pic 1767	0.302	0.002	1.56
	pic 1616 / pic 1767	0.730	0.003	1.15
	pic 875 / pic 1767	2.076	0.009	1.09
	pic 1767 / pic 875	0.482	0.002	1.09
20 %	pic 541 / pic 875	0.234	0.003	2.93
	pic 810 / pic 875	0.098	0.0006	1.46
	pic 1507 / pic 875	0.371	0.004	2.69
	pic 1616 / pic 875	0.704	0.007	2.45
	pic 541 / pic 1767	0.453	0.003	1.44
	pic 810 / pic 1767	0.191	0.001	1.83
	pic 1507 / pic 1767	0.719	0.008	2.75
	pic 1616 / pic 1767	1.366	0.009	1.62
	pic 875 / pic 1767	1.940	0.021	2.72
	pic 1767 / pic 875	0.516	0.006	2.74
35 %	pic 541 / pic 875	0.538	0.006	2.99
	pic 810 / pic 875	0.253	0.002	2.25
	pic 1507 / pic 875	0.902	0.005	1.52
	pic 1616 / pic 875	1.647	0.011	1.60
	pic 541 / pic 1767	0.761	0.007	2.47
	pic 810 / pic 1767	0.358	0.003	2.34
	pic 1507 / pic 1767	1.275	0.010	1.98
	pic 1616 / pic 1767	2.328	0.023	2.42
	pic 875 / pic 1767	1.414	0.016	2.84
	pic 1767 / pic 875	0.708	0.008	2.85

Tableau IV - 2.4-1 Moyennes et coefficients de variation des ratios des surfaces des pics du L-158,809 sur PLA, à la même position sur les microsphères, contenant 5 %, 10 %, 20 % ou 35 % de L-158,809 (n = 6 pour chaque échantillon).

IV - 2.4.4.2 Détermination des limites de détection et des limites de quantification des signaux.

Le Tableau IV – 2.4-3 montre la limite de détection et la limite de quantification du signal pour chaque ratios moyen des surfaces des pics normalement associés au L-158,809 sur ceux du PLA. Toutes les mesures sont faites sur des microsphères de PLA 49 898 PM, sans L-158,809. Les résultats obtenus montrent que les coefficients de variations (C.V.) des ratios moyens des surfaces des pics associés au L-158,809 sur ceux du PLA sont inférieurs à 10 %.

Ratios des surfaces des pics	Moyenne des ratios	Ecart type	Erreur type	Coefficient de Variation (%)	Limite de détection	Limite de quantification
Pic 541 / pic 875	0.04	0.003	0.001	7.17	0.049	0.069
Pic 810 / pic 875	0.034	0.003	0.001	8.15	0.043	0.062
Pic 1507 / pic 875	0.058	0.004	0.001	6.92	0.069	0.098
Pic 1616 / pic 875	0.061	0.004	0.001	6.68	0.073	0.102
Pic 541 / pic 1767	0.083	0.006	0.002	7.34	0.101	0.144
pic 810 / pic 1767	0.071	0.005	0.002	7.13	0.086	0.121
pic 1507 / pic 1767	0.119	0.008	0.003	6.6	0.143	0.198
pic 1616 / pic 1767	0.126	0.008	0.003	6.76	0.152	0.212
pic 875 / pic 1767	2.065	0.102	0.034	4.95	2.372	3.088
pic 1767 / pic 875	0.485	0.024	0.008	4.95	0.557	0.725

Tableau IV - 2.4-2 Limite de détection et limite de quantification du signal pour chaque ratios moyen des surfaces des pics normalement associés au L-158,809 sur ceux du PLGA. Les mesures sont faites sur des microsphères de PLA 49 898 PM, sans L-158,809 (n = 1).

Le Tableau IV – 2.4-3 montre la limite de détection et la limite de quantification du signal pour chaque ratios moyen des surfaces des pics normalement associés au

dexaméthasone sur ceux du PLGA. Toutes les mesures sont faites sur des microsphères de PLGA RG504, sans dexaméthasone. Enfin, les résultats obtenus montrent que les coefficients de variations (C.V.) des ratios moyens des surfaces des pics associés au dexaméthasone sur ceux du PLGA sont inférieurs à 10 %.

Ratios des surfaces des pics	Moyenne des ratios	Ecart type	Erreur type	Coefficient De Variation (%)	Limite de détection	Limite de quantification
pic 540 / pic 1770	0.052	0.004	0.001	7.80	0.064	0.092
pic 690 / pic 1770	0.054	0.004	0.002	8.26	0.068	0.099
pic 1194 / pic 1770	0.054	0.004	0.001	6.82	0.065	0.090
pic 1607 / pic 1770	0.147	0.013	0.005	8.56	0.185	0.273
pic 1662 / pic 1770	0.135	0.012	0.005	9.21	0.173	0.260

Tableau IV - 2.4-3 Limite de détection et limite de quantification du signal pour chaque ratios moyen des surfaces des pics normalement associés au dexaméthasone sur ceux du PLGA. Les mesures sont faites sur des microsphères de PLGA RG504, sans dexaméthasone (n = 6).

IV - 2.4.4.3 Contrôle de l'uniformité en principes actifs à la surface des microsphères de PLA et de PLGA nébulisées.

L'analyse enthalpique différentielle des microsphères polymériques nébulisées avec principe actif avait permis de constater que le principe actif microencapsulé était à l'état de dispersion moléculaire. C'est pourquoi, il est possible de se demander si le principe actif peut être aussi dispersé uniformément dans toute la matrice polymérique et de ce fait, sur toute la surface de la microsphère. L'évaluation de l'uniformité en principe actif, en particulier le L-158,809 ou le dexaméthasone, à la surface des microsphères de PLA 49 898

PM et de PLGA nébulisées, devrait permettre, d'une part, de répondre à la question et d'autre part, de d'apprécier la qualité de la microencapsulation par nébulisation.

Le Tableau IV – 2.4-4 montrent des moyennes et des coefficients de variation des ratios des surfaces des pics de L-158,809 sur des pics de PLA, à des positions différentes sur des microsphères de PLA 49 898 PM avec différentes teneurs de L-158,809.

Le Tableau IV – 2.4-5 montre des moyennes et des coefficients de variation des ratios des surfaces des pics de L-158,809 sur des pics de PLA, à des positions différentes sur des microsphères de PLA 49 898 PM avec L-158,809 (ratio des teneurs de PLA sur L-158,809 égale à 4) et à différentes teneurs de PEG-1540 distéarate.

Teneur en L-158,809 microencapsulé	Ratios des surfaces des pics	Moyenne des ratios	Erreur Type	Coefficient de variation (%)
5 %	pic 541 / pic 875	0.061	0.001	3.87
	pic 810 / pic 875	0.056	0.0006	2.94
	pic 1507 / pic 875	0.072	0.001	5.08
	pic 1616 / pic 875	0.184	0.004	5.31
	pic 541 / pic 1767	0.122	0.001	2.62
	pic 810 / pic 1767	0.113	0.001	2.92
	pic 1507 / pic 1767	0.145	0.002	4.00
	pic 1616 / pic 1767	0.369	0.007	4.55
	pic 875 / pic 1767	2.009	0.020	2.44
	pic 1767 / pic 875	0.498	0.005	2.44
10 %	pic 541 / pic 875	0.110	0.001	2.80
	pic 810 / pic 875	0.054	0.0007	3.44
	pic 1507 / pic 875	0.154	0.003	4.78
	pic 1616 / pic 875	0.351	0.006	4.67
	pic 541 / pic 1767	0.228	0.003	3.70
	pic 810 / pic 1767	0.112	0.001	2.94
	pic 1507 / pic 1767	0.320	0.005	2.94
	pic 1616 / pic 1767	0.730	0.015	5.47
	pic 875 / pic 1767	2.078	0.012	1.49
	pic 1767 / pic 875	0.481	0.003	1.49
20 %	pic 541 / pic 875	0.233	0.003	4.14
	pic 810 / pic 875	0.098	0.001	3.36
	pic 1507 / pic 875	0.349	0.006	4.84
	pic 1616 / pic 875	0.664	0.013	5.29
	pic 541 / pic 1767	0.470	0.008	4.90
	pic 810 / pic 1767	0.199	0.004	5.46
	pic 1507 / pic 1767	0.704	0.011	4.11
	pic 1616 / pic 1767	1.340	0.025	4.90
	pic 875 / pic 1767	2.020	0.035	4.60
	pic 1767 / pic 875	0.496	0.008	4.58
35 %	pic 541 / pic 875	0.519	0.009	4.69
	pic 810 / pic 875	0.228	0.004	5.26
	pic 1507 / pic 875	0.826	0.016	5.29
	pic 1616 / pic 875	1.578	0.030	5.10
	pic 541 / pic 1767	0.752	0.012	4.12
	pic 810 / pic 1767	0.331	0.007	5.80
	pic 1507 / pic 1767	1.198	0.020	4.44
	pic 1616 / pic 1767	2.288	0.041	4.78
	pic 875 / pic 1767	1.452	0.030	5.56
	pic 1767 / pic 875	0.690	0.014	5.41

Tableau IV - 2.4-4 Ratios des surfaces à des positions différentes sur les microsphères de PLA 49 898 PM contenant 5 %, 10 %, 20 % ou 35 % de L-158,809 (n = 6 pour chaque échantillon).

Teneur en PEG-1540 distéarate	Ratios des surfaces des pics	Moyenne des ratios	Erreur Type	Coefficient de variation (%)
3.84 %	pic 541 / pic 875	0.250	0.005	4.99
	pic 810 / pic 875	0.116	0.001	3.27
	pic 1507 / pic 875	0.362	0.007	5.18
	pic 1616 / pic 875	0.698	0.014	4.90
	pic 541 / pic 1767	0.447	0.010	5.65
	pic 810 / pic 1767	0.207	0.003	4.05
	pic 1507 / pic 1767	0.646	0.014	5.29
	pic 1616 / pic 1767	1.245	0.016	3.14
	pic 875 / pic 1767	1.785	0.028	3.87
7.4 %	pic 1767 / pic 875	0.561	0.009	3.93
	pic 541 / pic 875	0.234	0.004	4.76
	pic 810 / pic 875	0.112	0.0006	1.37
	pic 1507 / pic 875	0.345	0.003	2.32
	pic 1616 / pic 875	0.685	0.004	1.68
	pic 541 / pic 1767	0.480	0.010	5.24
	pic 810 / pic 1767	0.231	0.003	3.30
	pic 1507 / pic 1767	0.708	0.013	4.68
	pic 1616 / pic 1767	1.405	0.025	4.33
10.71 %	pic 875 / pic 1767	2.053	0.034	4.09
	pic 1767 / pic 875	0.488	0.008	4.28
	pic 541 / pic 875	0.241	0.004	3.47
	pic 810 / pic 875	0.113	0.0007	1.55
	pic 1507 / pic 875	0.378	0.004	2.38
	pic 1616 / pic 875	0.698	0.013	4.10
	pic 541 / pic 1767	0.469	0.004	1.92
	pic 810 / pic 1767	0.221	0.003	3.26
	pic 1507 / pic 1767	0.738	0.010	3.15
13.79 %	pic 1616 / pic 1767	1.365	0.034	5.65
	pic 875 / pic 1767	1.953	0.030	3.47
	pic 1767 / pic 875	0.512	0.008	3.52
	pic 541 / pic 875	0.241	0.005	4.55
	pic 810 / pic 875	0.125	0.002	4.52
	pic 1507 / pic 875	0.339	0.006	4.18
	pic 1616 / pic 875	0.759	0.009	2.67
	pic 541 / pic 1767	0.429	0.006	3.30
	pic 810 / pic 1767	0.223	0.002	2.26
	pic 1507 / pic 1767	0.604	0.012	4.52
	pic 1616 / pic 1767	1.353	0.03	4.99
	pic 875 / pic 1767	1.781	0.033	4.13
	pic 1767 / pic 875	0.562	0.010	4.11

Tableau IV - 2.4-5 Ratios des surfaces à des positions différentes sur les microsphères de PLA 49 898 PM avec L-158,809 et 3,84 %, 7,4 %, 10,71 % ou 13,79 % de PEG-1540 distéarate (n = 6 pour chaque échantillon).

Le Tableau IV – 2.4-6 montre des moyennes et des coefficients de variation des ratios des surfaces des pics de dexaméthasone sur des pics de PLA, à des positions différentes sur des microsphères de PLGA RG504 avec différentes teneurs de dexaméthasone.

Teneur en Dexaméthasone microencapsulée	Ratios des surfaces des pics	Moyenne des ratios	Erreur Type	Coefficient de variation (%)
5 %	pic 540 / pic 1770	0.049	0.001	5.62
	pic 690 / pic 1770	0.066	0.001	4.55
	pic 1194 / pic 1770	0.046	0.0008	4.58
	pic 1607 / pic 1770	0.122	0.002	4.48
	pic 1662 / pic 1770	0.32	0.006	4.72
10 %	pic 540 / pic 1770	0.074	0.001	4.92
	pic 690 / pic 1770	0.111	0.002	5.13
	pic 1194 / pic 1770	0.067	0.001	4.87
	pic 1607 / pic 1770	0.168	0.003	4.63
	pic 1662 / pic 1770	0.606	0.009	3.59
20 %	pic 540 / pic 1770	0.193	0.004	5.58
	pic 690 / pic 1770	0.220	0.004	5.22
	pic 1194 / pic 1770	0.153	0.003	5.83
	pic 1607 / pic 1770	0.387	0.009	5.75
	pic 1662 / pic 1770	1.259	0.016	3.21
35 %	pic 540 / pic 1770	0.415	0.007	4.19
	pic 690 / pic 1770	0.548	0.012	5.50
	pic 1194 / pic 1770	0.313	0.007	5.38
	pic 1607 / pic 1770	0.773	0.011	3.66
	pic 1662 / pic 1770	2.729	0.051	4.63

Tableau IV - 2.4-6 Ratios des surfaces à des positions différentes sur les microsphères de PLGA RG504 avec différentes teneurs de dexaméthasone.

L'analyse générale des six tableaux permet de dire que tous les coefficients de variation des ratios moyens restent inférieurs à 6 %.

En conséquence, il semble que par la microencapsulation par nébulisation de L-158,809 et de dexaméthasone au sein, respectivement, de PLA 49 898 PM (en présence et en absence de PEG-1504 distéarate) et de PLGA RG504, il soit possible de produire des microsphères pour lesquelles le principe actif soit uniformément réparti à leur surface, de telle sorte que n'importe quelle déviation standard soit inférieure au six centième du ratios moyen correspondant, des surfaces des pics du principe actif sur ceux ou celui du polymère. En d'autres termes, il est possible d'accepter qu'une valeur du coefficient de variation inférieure à 6 %, soit indicative de l'uniformité en principe actif (L-158,809 ou dexaméthasone) sur toute la surface des microsphères polymériques nébulisées (PLA ou PLGA).

IV - 2.4.5 Application potentielle de la spectroscopie Raman pour contrôler quantitativement la présence de principes actifs dans des microsphères de PLA et PLGA nébulisées.

Puisque les principes actifs sont uniformément répartis et dispersés à la surface des microsphères de PLA et de PLGA nébulisées, il est maintenant permis de présumer qu'ils le sont aussi à l'intérieur des microsphères.

La démarche consisterait maintenant à rechercher une relation graphique entre la teneur théorique en principe actif microencapsulé et les ratios moyens obtenus entre les surfaces des pics du principe actif sur ceux (dans le cas des microsphères de PLA) ou celui (dans le cas des microsphères de PLGA) du polymère. L'intérêt, dans ce raisonnement, est que cette courbe graphique serait l'équivalente d'une courbe standard de référence, obtenue à partir d'une relation graphique entre des teneurs, théoriques ou, mieux encore, connues (c'est à dire déterminées par une autre technique analytique comme la spectrophotométrie UV-Visible) en médicament versus les ratios moyens des surfaces des pics du même médicament sur ceux du polymère. Par conséquent, en référence à cette

courbe standard, la quantité en principe actif dans des microsphères polymériques, avec une teneur inconnue en médicament ou une teneur en médicament qui a varié lors d'études de stabilité, pourrait être déterminée précisément par la prise d'un seul spectre Raman puis par le calcul des ratios entre les surfaces des pics du médicament sur ceux du polymère constitutif des microsphères.

En suivant cette hypothèse, il a été possible d'obtenir la Figure IV – 2.4-7 et la Figure IV – 2.4-8, qui mettent clairement en évidence que des courbes des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur du PLA (pic 875 et pic 1767) en fonction de la teneur en L-158,809 encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM, peuvent être obtenues. De plus, l'observation des deux figures semble indiquer que l'allure des courbes graphiques diffère selon les pics choisis du PLA et du L-158,809. Ainsi par exemple, lorsque le pic du PLA est le pic 875 (Figure IV – 2.4-7) l'allure des courbes semble moins linéaire que celle observée lorsque le pic du PLA est le pic 1767 (Figure IV – 2.4-8).

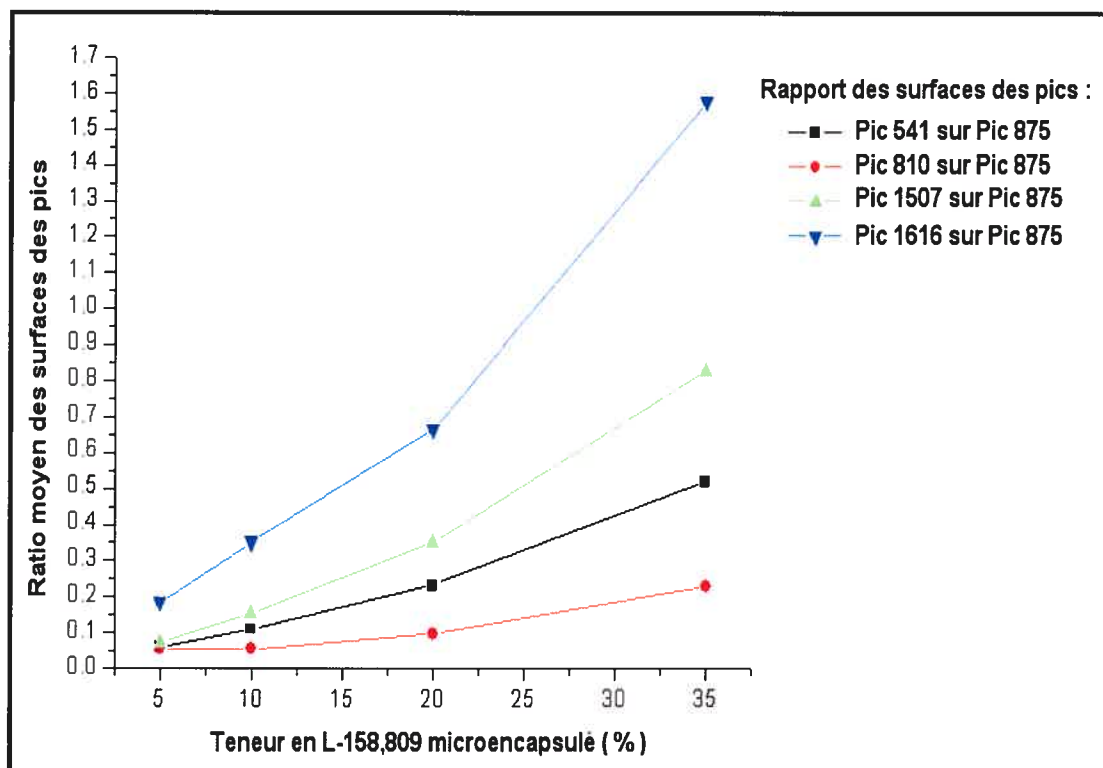


Figure IV - 2.4-7 Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 875 du PLA en fonction de la teneur en L-158,809 encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM.

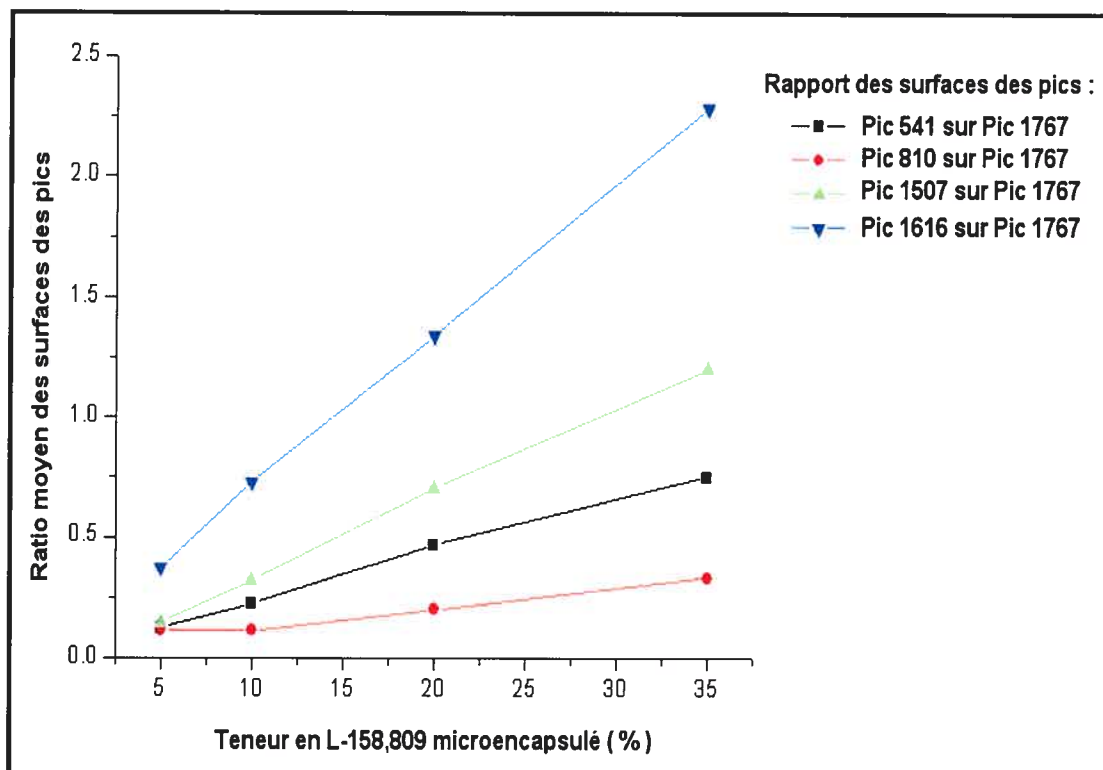


Figure IV - 2.4-8 Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 1767 du PLA en fonction de la teneur en L-158,809 encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM.

En poursuivant dans le même sens, il a été aussi possible d'obtenir la Figure IV – 2.4-9 et la Figure IV – 2.4-10, qui mettent clairement en évidence que des courbes des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur du PLA (pic 875 et pic 1767) en fonction de la teneur en PEG-1540 distéarate encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM, qui contiennent une teneur constante en L-158,809 (le rapport de la teneur du PLA sur celle du L-158,809 égale quatre), peuvent être obtenues. De plus, comme la teneur en L-158,809 est théoriquement constante dans chaque microsphère, il devenait intéressant d'évaluer qualitativement le respect de cette constante, lorsque la teneur en PEG-1540 distéarate varie, par l'allure des courbes des Figures IV – 2.4-9 et IV – 2.4-10. En effet, si

la teneur en L-158,809 est bien constante dans chaque microsphère alors les ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur du PLA devraient être aussi constants.

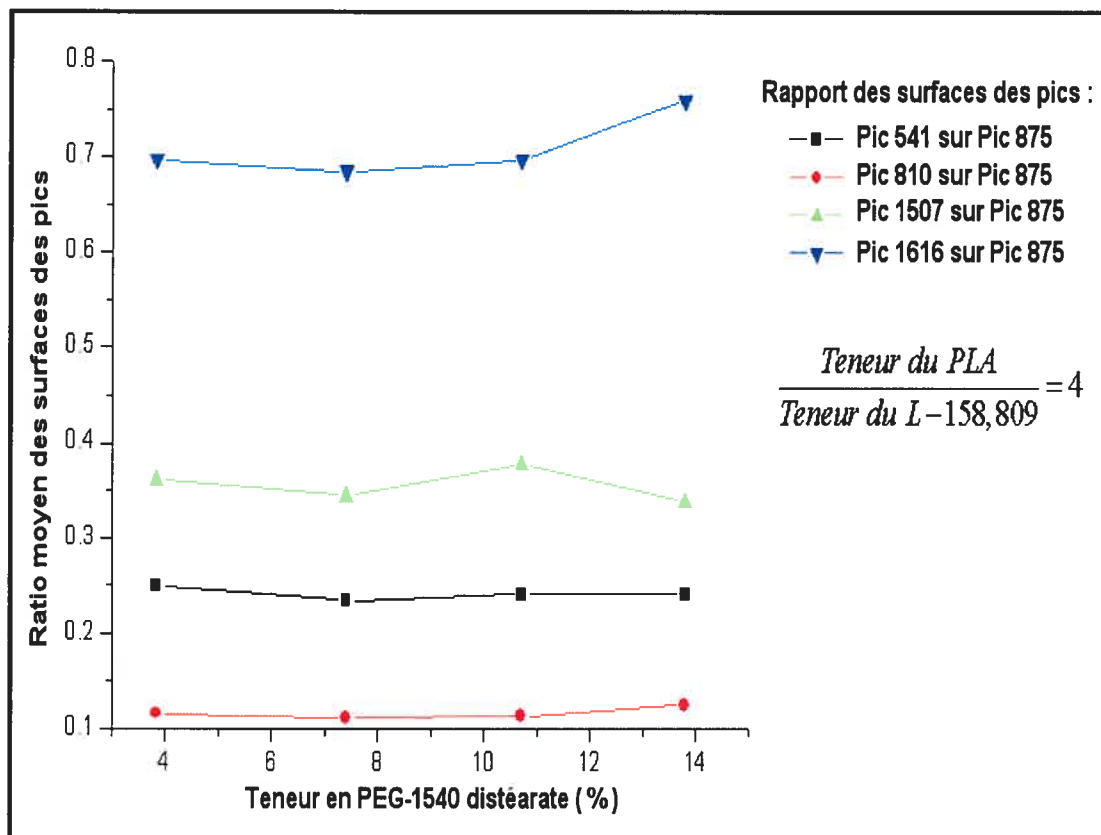


Figure IV - 2.4-9 Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 875 du PLA en fonction de la teneur en PEG-1540 distéarate encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM, qui contiennent une teneur constante en L-158,809 (le rapport de la teneur du PLA sur celle du L-158,809 égale quatre).

Mais, en fait, il est bien difficile d'appliquer ce raisonnement dans son intégralité car selon les pics du L-158,809 et du PLA, l'allure des courbes ratios des surfaces des pics en fonction des concentrations de PEG-1540 distéarate, peut être différente. Par exemple, l'allure des courbes (Figure IV – 2.4-9), lorsque les ratios moyens sont déterminés par le pic 541 ou 810 du L-158,809 et le pic 875 du PLA, semblent indiquer que la teneur en L-

158,809 reste constante dans les microsphères peu importe la teneur en PEG-1540 distéarate. Par contre, lorsque les ratios moyens sont déterminés par le pic 1507 ou 1616 du L-158,809 et le pic 875 du PLA, l'allure des courbes (Figure IV – 2.4-9) semble indiquer que la teneur en L-158,809 varie dans les microsphères selon la concentration de PEG-1540 distéarate. Ces variations pourraient être expliquées par le fait que l'environnement chimique, dans la zone volumique (des microsphères) enregistrée par le spectromètre Raman, change lorsque la teneur en PEG-1540 distéarate augmente et il n'y aurait donc pas forcément une corrélation linéaire identique pour tous les nombres d'onde, c'est à dire pour tous les pics.

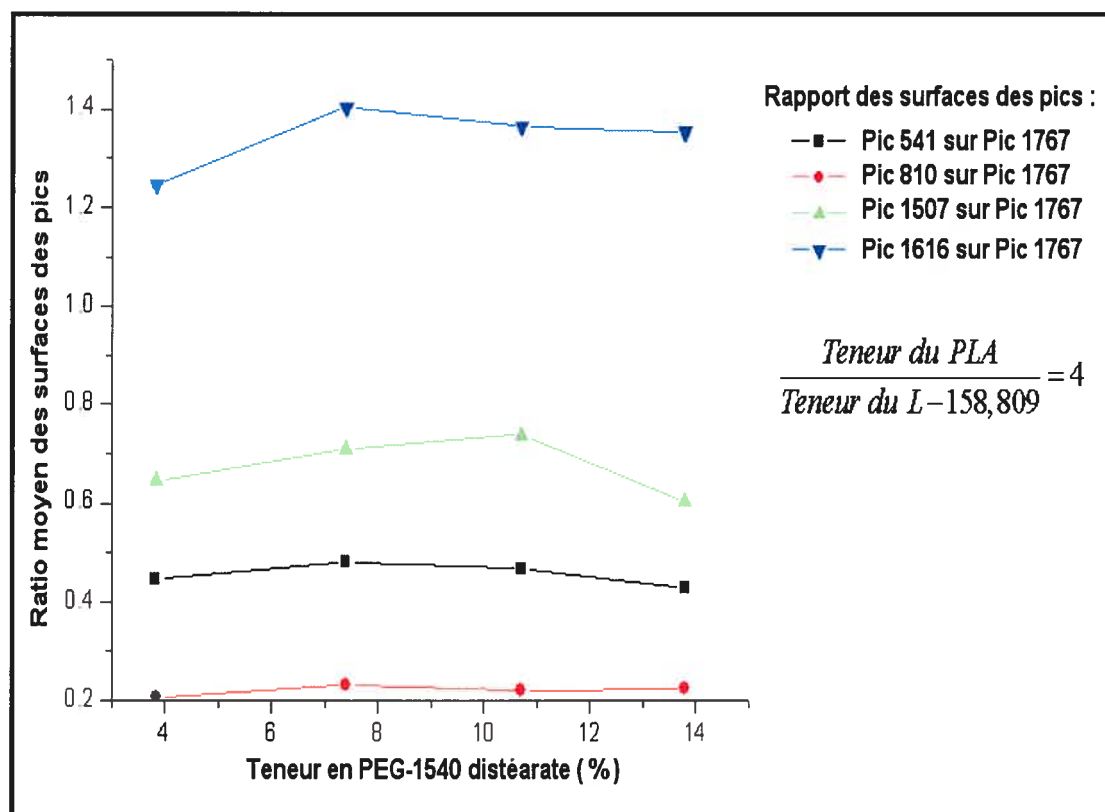


Figure IV - 2.4-10 Courbe des ratios moyens des surfaces des pics du L-158,809 sur le pic 1767 du PLA en fonction de la teneur en PEG-1540 distéarate encapsulé dans des microsphères de PLA 49 898 PM, qui contiennent une teneur constante en L-158,809 (le rapport de la teneur du PLA sur celle du L-158,809 égale quatre).

Lorsque le médicament est la dexaméthasone, il a été aussi possible d'obtenir (Figure IV – 2.4-11) des courbes des ratios moyens des surfaces des pics de la dexaméthasone sur du PLGA (pic 1770) en fonction de la teneur en dexaméthasone encapsulée dans des microsphères de PLGA 48 000 PM. De plus, l'allure des courbes graphiques diffère selon le pic choisi de la dexaméthasone.

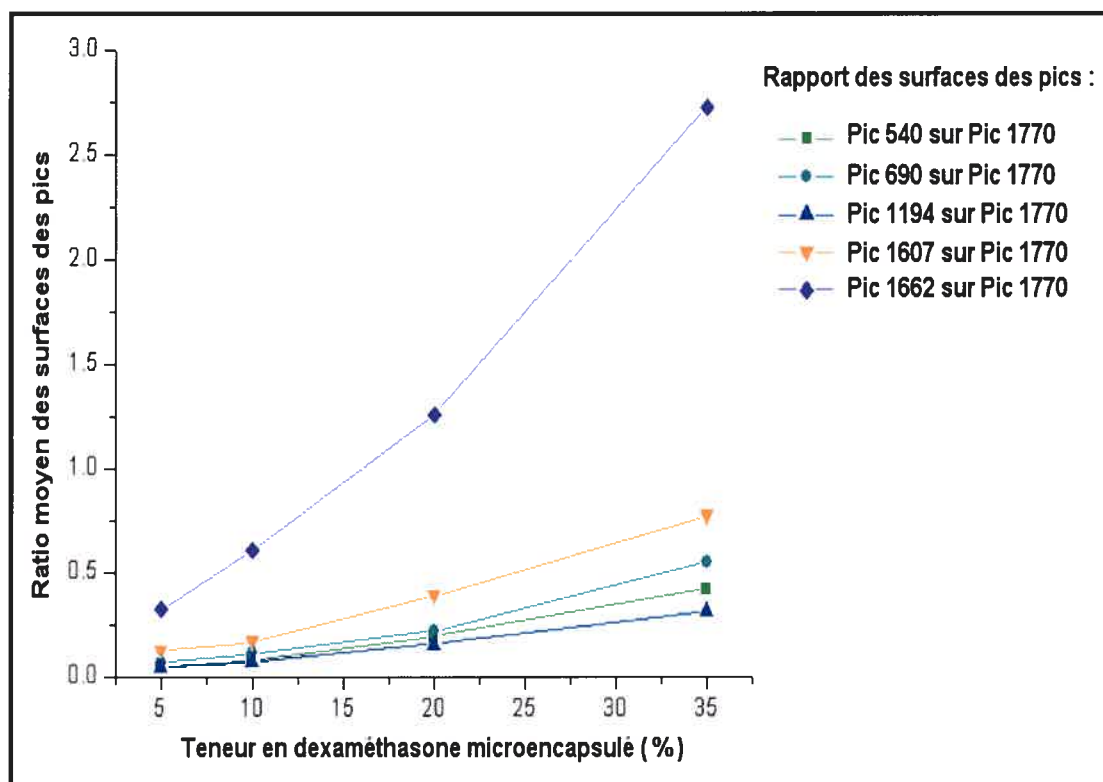


Figure IV - 2.4-11 Courbe des ratios moyens des surfaces des pics de la dexaméthasone sur le pic 1770 du PLGA en fonction de la teneur en dexaméthasone encapsulé dans des microsphères de PLGA 48 000 PM.

Finalement toutes les Figures IV – 2.4-7, IV – 2.4-8, IV – 2.4-9, IV – 2.4-10, IV – 2.4-11 tendent à confirmer qu'il est bien possible de trouver une relation graphique entre la teneur théorique en principe actif microencapsulé et les ratios moyens obtenus entre les

surfaces des pics du principe actif sur ceux (dans le cas des microsphères de PLA) ou celui (dans le cas des microsphères de PLGA) du polymère.

Il serait possible de déterminer des courbes standards de référence, obtenues à partir d'une relation graphique entre des teneurs, théoriques ou connues (c'est à dire déterminées par une autre technique analytique comme la spectrophotométrie) en médicament versus les ratios moyens des surfaces des pics du même médicament sur ceux du polymère. En conséquence, la possibilité d'utiliser ce genre de relation graphique aurait un potentiel d'application certain dans la détermination de la teneur en principe actif dans des microsphères, qui peuvent avoir été par exemple soumises à des études de stabilité. De plus, la possibilité de quantifier le principe actif sans avoir à dénaturer les microsphères trouve tout son plein intérêt puisque l'utilisation de la spectrométrie Raman, qui s'effectue sur une très petite quantité d'échantillon, ne dénature pas l'échantillon, en d'autres termes il n'est pas nécessaire de solubiliser les microsphères dans un solvant comme cela est le cas dans la spectrophotométrie.

IV - 2.5 Évaluation de la cinétique de libération, *in vitro*, de L-158,809 et de Captopril à partir de microsphères nébulisées de PLA, avec et sans PEG-1540 distéarate.

Toutes les microsphères de PLA qui devaient être utilisées dans les expériences *in vivo* contenaient du polyéthylène glycol distéarate (PEG distéarate). Cette molécule a été introduite dans les formulations parce qu'elle est susceptible de rendre les microsphères furtives aux macrophages grâce à ses longues chaînes hydrocarbonées. Cependant, il existe plusieurs catégories de polyéthylène glycol distéarate, qui diffèrent entre elles par leurs caractéristiques physico-chimiques propres comme par exemple le polyéthylène glycol 400 distéarate ou poloxyl 8 distéarate (point de fusion à 36°C et dispersible dans l'eau), le polyéthylène glycol 600 distéarate ou poloxyl 12 distéarate (point de fusion à 39°C et

soluble dans l'eau), le polyéthylène glycol 1540 distéarate ou poloxyl 32 distéarate (point de fusion à 45°C et soluble dans l'eau). Le choix de la molécule de PEG-distéarate a reposé essentiellement sur l'objectif recherché, en considérant les conditions d'administration des microsphères. L'administration des microsphères de PLA avec L-158,809 et/ou avec Captopril concernait prioritairement le dépôt périvasculaire autour d'artères carotides, endommagées par une angioplastie au ballonnet. Comme les corrélations entre les cinétiques de libération de médicament *in vitro* et *in vivo* s'accordent rarement, il était plutôt important de considérer le fait que les microsphères devaient être déposées de façon périvasculaire, donc par conséquent être placées dans un environnement humide et à 37 °C, plutôt que de penser qu'elles seraient immergées dans un milieu aqueux comme cela est le cas des études de libération *in vitro* des médicaments, qui se réalisent habituellement par immersion en milieu aqueux de tampon phosphate, à pH 7,4 et à 37 °C. Par conséquent, le choix de la molécule de polyoxyéthylène distéarate était alors le PEG-1540 distéarate car son point de fusion est 45 °C, ce qui devait permettre aux microsphères de PLA, qui la possédaient, de conserver leur intégrité structurale à 37 °C. Ce choix en rapport avec le point de fusion a été réalisé au détriment de celui sur la solubilité du PEG-1540 distéarate, qui est soluble dans l'eau, puisque les microsphères devaient être seulement déposées en périvasculaire des carotides et non pas immergées dans un milieu aqueux. Il faudrait alors s'attendre à ce que la libération *in vivo* du médicament soit plus lente que celle *in vitro*. Par ailleurs, les études de libération *in vitro* du médicament étaient utiles car bien qu'il était important de s'assurer que le principe actif se libère des microsphères polymériques de PLA, il était tout aussi important de s'assurer qu'il soit en mesure de se libérer *in vitro* complètement, voire majoritairement, en dedans de quatorze jours puisque c'est le temps qui correspond au développement *in vivo* de la resténose carotidienne chez des rats ayant subi une angioplastie de la carotide.

Selon la Figure IV – 2.5-1, il semble que les microsphères de PLA 50-50 et 60-40 contenant 10 % de L-158,809 libèrent respectivement plus de 45 % et plus de 50 % de L-158,809, rapidement dans un intervalle de temps de 15 minutes, après être immergées dans un milieu aqueux de tampon phosphate à pH 7,4 et à 37 °C. Lorsque la charge de principe

actif microencapsulé était 20 %, cette libération rapide de L-158,809 dépassait 60 % pour les deux formulations. Cette observation montre bien l'importance de trouver des conditions d'enfouissement efficaces en vue de l'application *in vivo* des microsphères dans les études d'évaluation de l'inhibition de la prolifération néo-intimale par le L-158,809. Cet effet de libération rapide (*burst effect*) pourrait être dû à la présence de L-158,809 à la surface, voire proche de la surface, des microsphères de PLA.

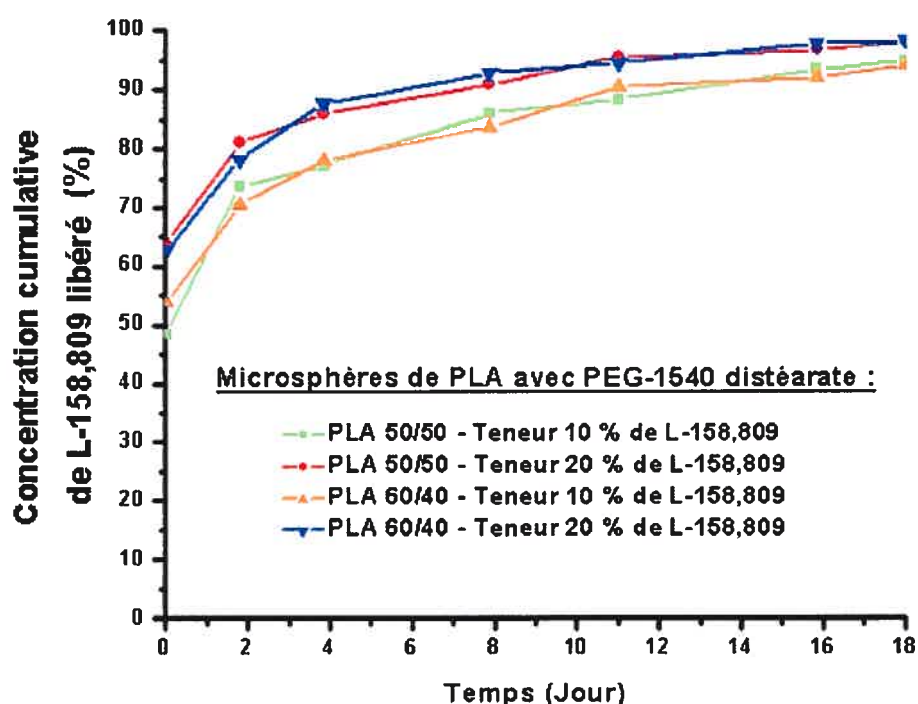


Figure IV - 2.5-1 Cinétique de libération *in vitro* du L-158,809 des microsphères de PLA 50-50 et 60-40, contenant du PEG-1540 distéarate.

Cette explication est appuyée par les résultats des analyses thermiques enthalpiques différentielles (DSC) qui avaient permis de mettre en évidence que le L-158,809, au sein de la microsphère de PLA, était sous la forme d'une dispersion solide moléculaire et non pas sous la forme d'une dispersion particulaire cristalline ce qui signifie alors une répartition

homogène du L-158,809 dans toute la microsphère de PLA. Par conséquent, le L-158,809 devait être aussi réparti uniformément tant à la surface qu'à l'intérieur de la microsphère de PLA. De plus, les résultats des analyses par spectroscopie Raman des microsphères de PLA avec PEG-1540 distéarate et L-158,809, corroboraient également cette explication apportée pour l'effet de burst du L-158,809. En effet, il avait été possible de mettre en évidence l'uniformité chimique, en L-158,809, à la surface des microsphères de PLA, avec ou sans PEG-1540 distéarate.

De plus, la Figure IV-2.5-1 indique aussi qu'après sept jours d'immersion, les microsphères de PLA avec 10 % de L-158,809 avaient libérées plus de 83 % de principe actif tandis que celles avec une charge de 20 % en avaient libérées plus de 90 %. Après dix huit jours d'immersion toutes les microsphères de PLA semblaient contenir moins de 6 % de L-158,809. Il est alors possible de considérer que la libération *in vitro* du principe actif hors des microsphères de PLA ait été en grande partie complétée en quatorze jours.

De plus, les analyses de DSC avaient mis en évidence que la nébulisation semblait baisser la variation de la capacité calorifique du polymère, procurant une disposition plus ordonnée des chaînes polymériques. L'adoption de la forme sphérique, qui est la morphologie énergétique la plus stable, contribuait aussi à favoriser et renforcer cette disposition de stabilité des chaînes. En outre, la nébulisation, qui semblait augmenter la chaleur de fusion du pic de relaxation enthalpique, présent dans le polymère brut, laissait à penser que ce processus compactait, voire rendait plus dense les microsphères polymériques, puisque ces dernières devaient absorber plus d'énergie pour atteindre l'enthalpie de l'état caoutchouteux. Autrement dit, les microsphères nébulisées de PLA pouvaient se concevoir comme des matrices polymériques sphériques, dont le réseau des chaînes de polymère devait être particulièrement compact, avec des régions ordonnées plus nombreuses. Au sein de ces matrices polymériques, le principe actif, en occurrence le L-158,809, était dispersé sous forme moléculaire. Quant au PEG-1540 distéarate, il devait probablement s'y trouver par plage et non dispersé sous forme moléculaire, selon les analyses de DSC. Ainsi, en immersion complète, après l'effet de « burst », le front de solvant, progressant dans la matrice polymérique des microsphères, solubilisait le PEG-1540 distéarate donnant lieu ainsi à un réseau de canaux tortueux au sein de la matrice

polymérique, laquelle garde toutefois sa structure morphologique sphérique. La cinétique de libération du L-158,809 hors des microsphères polymériques de PLA est donc celle d'un système matriciel diffusionnel, dans lequel le principe actif diffuse lentement à travers la matrice polymérique, en empruntant un réseau de canaux tortueux. Enfin, il faut noter aussi que les analyses par spectroscopie de corrélation de photons avaient révélé la possibilité que les microsphères puissent être agglomérées. La présence d'agglomérat pourrait contribuer alors à ralentir davantage la cinétique de libération du L-158,809 hors des microsphères polymériques. Enfin, le fait qu'il semble rester moins de 6 % de L-158,809 dans les microsphères de PLA pourrait être attribué à des erreurs (pertes) dans les manipulations expérimentales. Puisque pour ces microsphères de PLA en immersion *in vitro*, la grande majorité du principe actif était libérée en dedans de quatorze jours, il était alors possible d'estimer que si ces mêmes microsphères étaient placées dans un environnement humide à 37 °C, tel que l'environnement périvasculaire des artères, elles pourraient libérer plus lentement encore le L-158,809.

En conséquence, bien que les études de cinétique de libération *in vitro* du L-158,809 étaient guères déterminantes pour les expériences *in vivo* à venir, il était cependant possible d'y apprécier la pertinence en considérant que les formulations de ces microsphères demeuraient appropriées puisque d'une part leur destinée était la voie périvasculaire et que d'autre part la libération de L-158,809, souhaitée, devait être constante sur quatorze jours dans l'espoir de détecter une inhibition de la prolifération néo-intimale des carotides de rat, endommagées par une procédure d'angioplastie. En outre, sachant que l'angioplastie au ballonnet, qui endommage l'endothélium vasculaire, conduit à un processus inflammatoire au site de la lésion artérielle, la libération rapide du L-158,809, les premiers jours de l'implantation des microsphères, ne pourrait être que profitable en regard du processus d'inflammation.

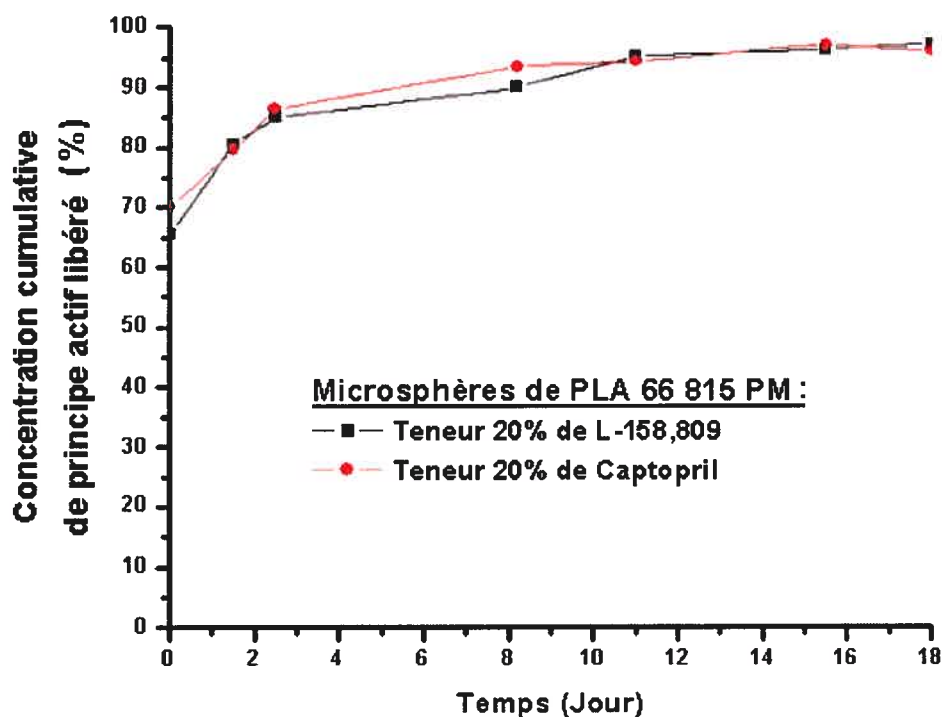


Figure IV - 2.5-2 Cinétique de libération *in vitro* du L-158,809 et du Captopril des microsphères de PLA 66 815 PM sans PEG-1540 distéarate.

La situation de la Figure IV – 2.5-2 diffère de la précédente car dans cette situation, les microsphères ne possédaient pas de PEG-1540 distéarate. Pourtant il était possible de constater une libération immédiate du L-158,809 et du Captopril dans les quinze premières minutes suivant le début de la cinétique. Ces libérations rapides correspondent à plus de 65 % dans le cas du L-158,809 et à plus de 70 % dans le cas du Captopril. L'explication de ce « *burst* » pour ces deux substances reste similaire à celle apportée précédemment. Ainsi, le L-158,809 et le Captopril, à la surface ou proche de la surface des microsphères de PLA 66 815 PM, seraient libérés rapidement dans les quinze premières minutes dès le début de l'immersion. De plus, la Figure IV-2.5-2 indique aussi qu'après deux jours d'immersion, les microsphères de PLA avaient libéré plus de 85 % de chacun des principes actifs. Après huit jours, il s'agissait d'une libération de plus de 90 % de chacun des principes actifs. Également après dix huit jours d'immersion, toutes les microsphères de PLA semblaient

contenir moins de 5 % de L-158,809 et de Captopril. Il est alors possible de considérer que la libération in vitro des principes actifs hors des microsphères de PLA ait été en grande partie complétée en quatorze jours. Le fait qu'il semble rester moins de 5 % de L-158,809 et de Captopril dans les microsphères de PLA pourrait être attribué aussi à des erreurs et des pertes dans les manipulations expérimentales. Il était possible également d'estimer que ces mêmes microsphères, placées dans un environnement humide, tel que l'environnement périvasculaire, et non pas immergées comme dans le cas des études de cinétiques de libération, puissent libérer plus lentement le L-158,809 et le Captopril.

Comme précédemment, toutes les observations et remarques quant à la cinétique de libération des principes actifs hors des microsphères polymériques de PLA s'appliquent également. Ainsi, il s'agit de la cinétique de libération de principe actif d'un système matriciel diffusionnel, dans lequel les principes actifs diffusent lentement à travers la matrice polymérique. Par ailleurs, il faut souligner que le retrait du PEG-1540 distéarate de ces formulations avait été effectué dans l'espoir de ralentir la libération du médicament mais il n'a pas été possible de l'obtenir, comme l'illustre la Figure IV – 2.5-2. En effet, la libération du L-158,809 dans la Figure IV – 2.5-2 n'était guère significativement différente de celle de la Figure IV – 2.5-1, pour la charge de 20 %. Il semble donc que l'effet de la petite taille, qui était en dessous de trois microns, de ces microsphères polymériques nébulisées l'emporte sur leur composition en excipient.

IV - 3 Application *in vivo* des microsphères dans des études d'évaluation de l'inhibition de la prolifération néo-intimale par le L-158,809 et le Captopril, à partir d'un modèle d'artère de rats.

La microencapsulation de principe actif, comme par exemple le L-158,809, dans du PLA ne trouve sa pleine utilité que si le médicament est effectivement en mesure de se libérer de sa matrice polymérique lorsqu'il est placé dans un environnement *in vivo* et produire le ou les effets pharmacologiques pour lesquels il a été employé. Toutes considérations du protocole expérimental étant validées, l'observation d'effets pharmacologiques significatifs, pour un seuil de signification choisi (par exemple 0,05), signifierait que le principe actif microencapsulé aurait bien été libéré des microsphères polymériques de PLA. En fait, il importait avant tout de valider l'outil de technologie pharmaceutique et sa formulation et en aucun cas de développer une formulation commercialement acceptable, ni même de trouver un traitement pharmacologique dans le but d'améliorer l'inhibition de la prolifération néo-intimale. Pour cette démarche, les études pharmacologiques, *in vivo*, se rapportent à l'évaluation de l'inhibition de l'hyperplasie néo-intimale, après dépôt périvasculaire de L-158,809 microencapsulé dans du PLA avec PEG-1540 distéarate, dans des modèles d'artère de rat, avec angioplastie. L'inhibition de la prolifération néo-intimale a aussi été évaluée, par dépôt périvasculaire, de bi-médication dont les deux principes actifs étaient le L-158,809 et le Captopril, microencapsulés dans du PLA.

IV - 3.1 Administration périvasculaire de L-158,809 microencapsulé dans des microsphères de PLA avec PEG-1540 distéarate.

Deux formulations de microsphères de PLA, avec PEG-1540 distéarate, ont servi de modèles de vectorisation pour le L-158,809 : Les microsphères de PLA 50-50 et les microsphères de PLA 60-40.

IV - 3.1.1 Dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50, avec L-158,809.

Afin de mieux illustrer et apprécier qualitativement les proportions relatives des surfaces de coupes vasculaires entre elles, une représentation en perspective est présentée pour chaque groupe expérimental de rats dans la Figure IV-3.1-1.

Cette figure présente les surfaces moyennes de l'intima, de la média et de la lumière artérielle pour les groupes de rats suivants :

- Le groupe avec angioplastie et avec microsphères PLA 50-50 sans L-158,809 (A)
- Le groupe avec angioplastie et avec microsphères PLA 50-50 contenant 10 % de L-158,809 (B)
- Le groupe avec angioplastie et avec microsphères PLA 50-50 contenant 20 % de L-158,809 (C)
- Le groupe avec angioplastie et sans traitement en microsphères (D)
- Le groupe sans angioplastie et sans traitement en microsphères (E)

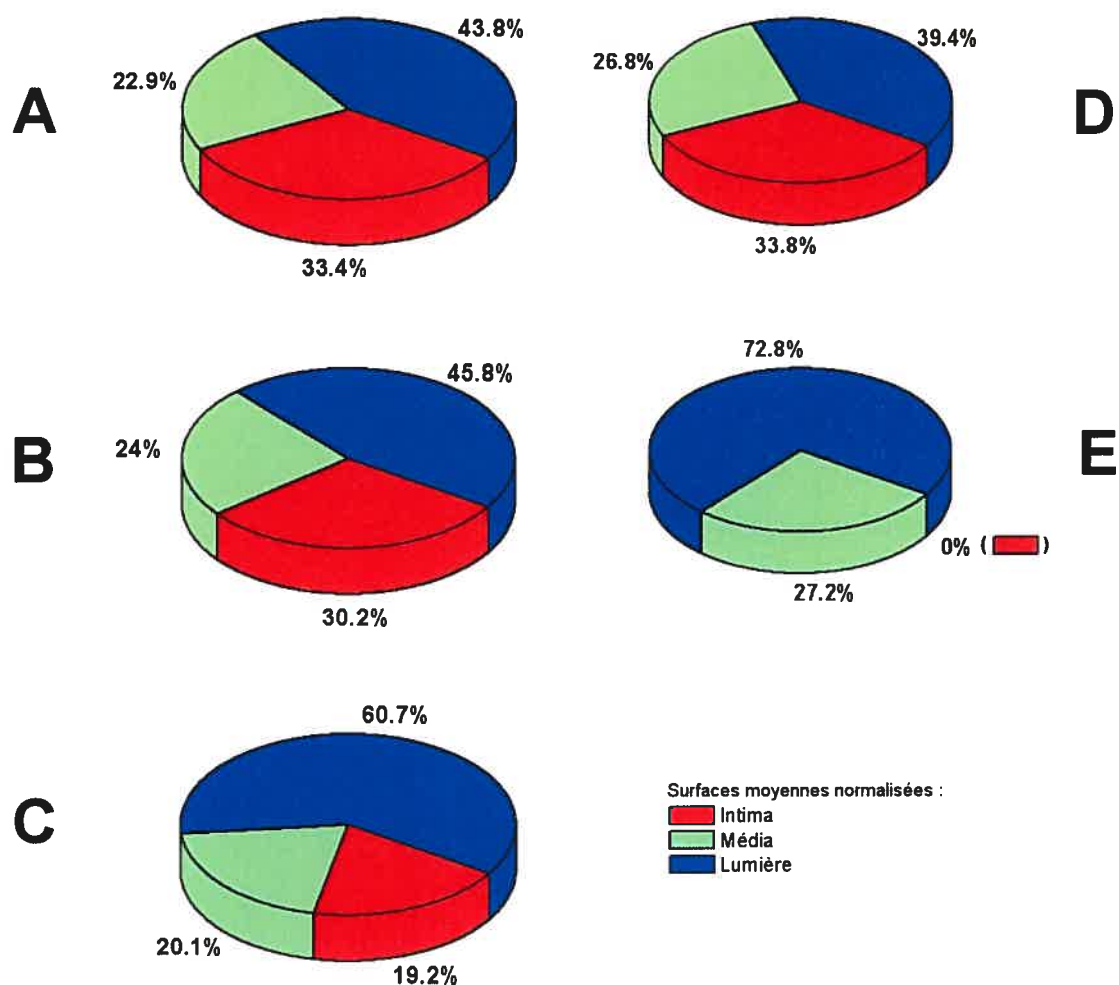


Figure IV - 3.1-1 Surfaces moyennes normalisées de l'intima, média et lumière artérielle de cinq groupes de rats : le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809 microencapsulé (A)(n = 4); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 10 % de L-158,809 (B)(n = 6); le groupe avec angioplastie, et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 20 % de L-158,809 (C) (n = 5); le groupe avec angioplastie et sans traitement en microsphères de PLA 50-50 (D) (n = 5); le groupe sans angioplastie et sans traitement en microsphères de PLA 50-50 (E) (n = 6).

En l'absence d'angioplastie (Figure IV-3.1-1 : E), la surface de la lumière artérielle (72,8 %) semble être supérieure à celles, de l'intima (0 %) et de la média (27,2 %) réunies. Il est alors intéressant de noter que la surface de l'intima reste négligeable comparativement à celle de la média et à celle de la lumière.

Après une angioplastie et en absence de tout dépôt de microsphères ou de médication (Figure IV-3.1-1 : D), un phénomène de resténose se développe bien au sein des artères endommagées et la résultante est alors un rétrécissement de la lumière artérielle puisque la surface luminale artérielle ne représenterait plus que 39,4 % de la surface totale de l'artère. Il y a nettement une augmentation de la surface intimale qui semble être de 33,8 % tandis que la surface de la média (26,8 %) ne représenterait qu'une baisse de 1,5 %, en comparaison à la valeur de 27,2 % (Figure IV-3.1-1 : E).

Après un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec ou sans L-158,809, la surface intimale demeure encore présente mais est non négligeable, comme semblent le montrer les parties A (surface intimale de 33,4 %), B (surface intimale de 30,2 %) et C de la Figure IV – 3.1-1 (surface intimale de 19,2 %). Il semble que la surface intimale diminue lorsque le taux de L-158,809 microencapsulé augmente, puisqu'elle passe de 33,4 % (0 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : A) à 30,2 % (10 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : B) et à 19,2 % (20 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : C).

Quant à la surface luminale, elle semble augmenter lorsque le taux de L-158,809 microencapsulé augmente, puisqu'elle passe de 43,8 % (0 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : A) à 45,8 % (10 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : B) et à 60,7 % (20 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : C).

Par contre les changements de la surface de la média ne semblent pas dépendre de la dose de médicament microencapsulé puisque la surface de la média semble varier de 22,9 % (0 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : A) à 24 % (10 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : B) et à 20,1 % (20 % de L-158,809 - Figure IV – 3.1-1 : C).

Les figures suivantes montrent pour chaque groupe expérimental de rats, dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809, les données relatives au paramètre à l'étude, c'est-à-dire la surface normalisée des lumières artérielles (Figures IV – 3.1-2), la prolifération néo-intimale (Figures IV – 3.1-3) et les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (Figures IV – 3.1-4) puis représentent ce paramètre sous la forme de points et sous la forme de « boîte à pattes ». Toutes ces figures possèdent la même légende quant à la représentation de la « boîte à pattes », laquelle n'est rapportée seulement que dans la première figure (Figures IV – 3.1-2) afin d'éviter les redondances. Les effectifs animaux pour chaque groupe sont représentés par les points.

Le choix des paramètres repose sur plusieurs considérations. Ainsi, bien que l'objectif principal des études *in vivo* vise à évaluer la capacité d'inhiber l'hyperplasie néo-intimale, au moyen d'un principe actif, notamment le L-158,809, la finalité de ces études devrait se refléter sur le diamètre de la lumière artérielle. Quant au paramètre de la prolifération néo-intimale, il correspond en fait au rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la lumière artérielle et tout changement du diamètre luminal ou de la surface de la néo-intima devrait se refléter sur ce paramètre. En conséquence, l'hyperplasie néo-intimale qui est observée après une procédure d'angioplastie artérielle, devrait, en toute logique, être aussi évaluée sur la base de ce paramètre. Enfin, le rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média a été évalué sur la base que tout remodelage vasculaire devrait pouvoir se refléter sur la néo-intima et sur la média.

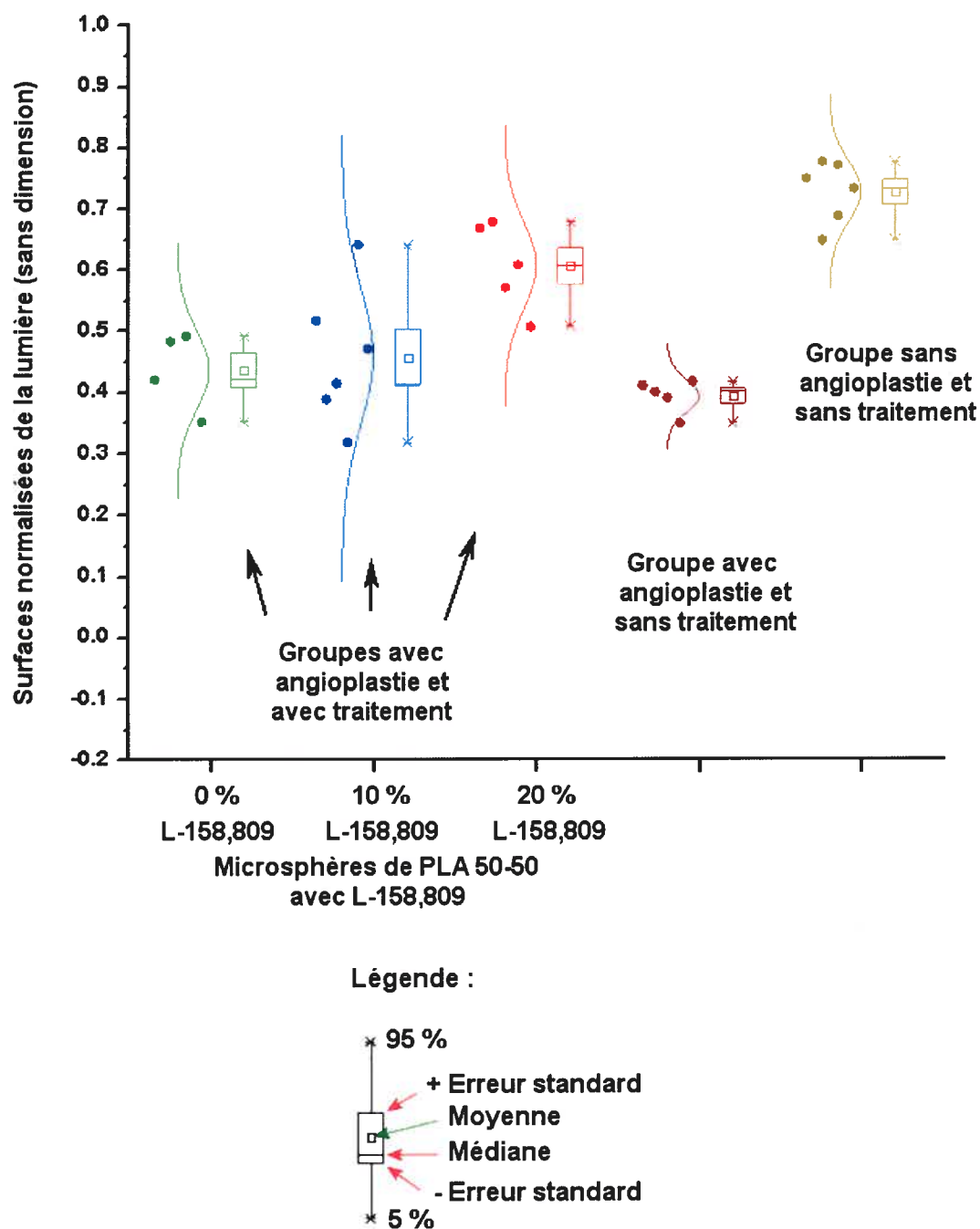


Figure IV - 3.1-2 Surfaces normalisées des lumières artérielles des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

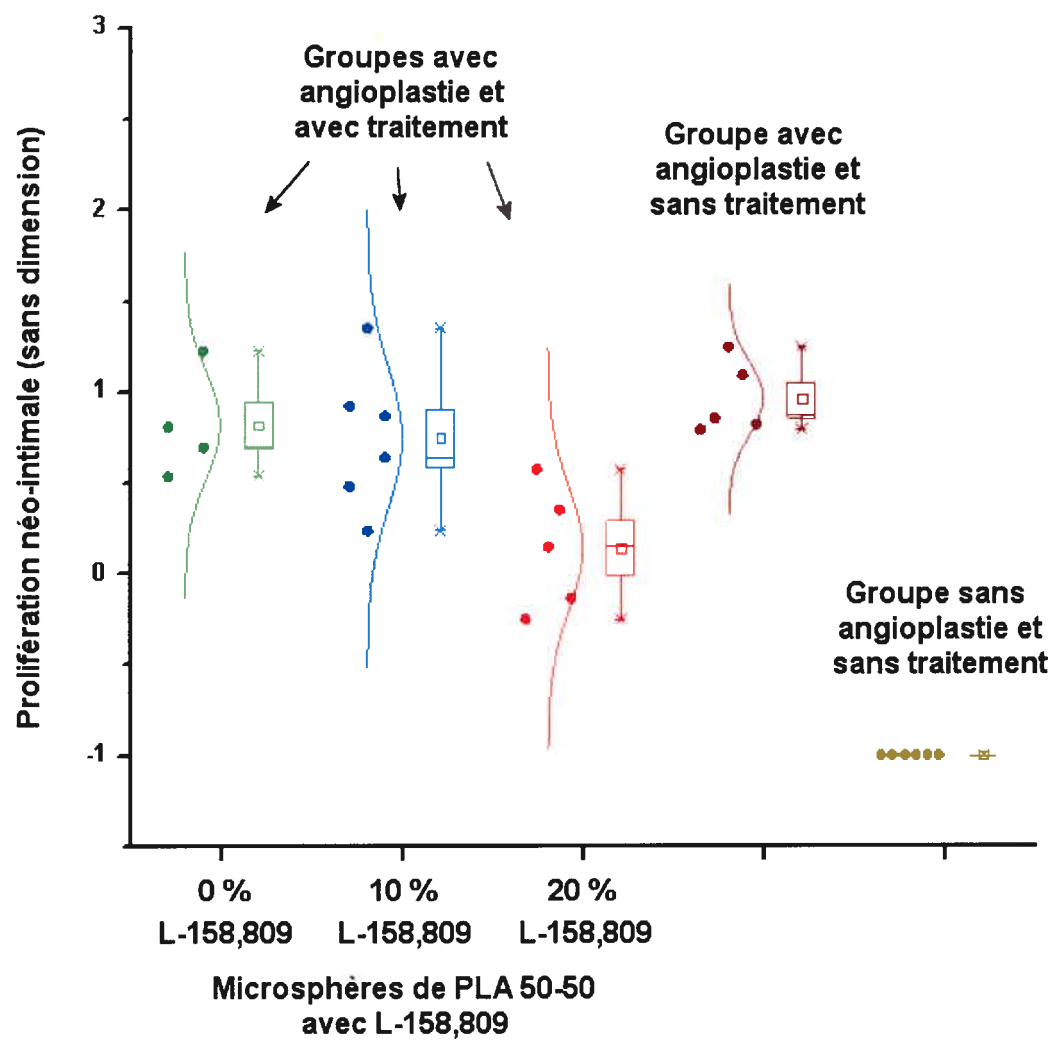


Figure IV - 3.1-3 Proliférations néo-intimales des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

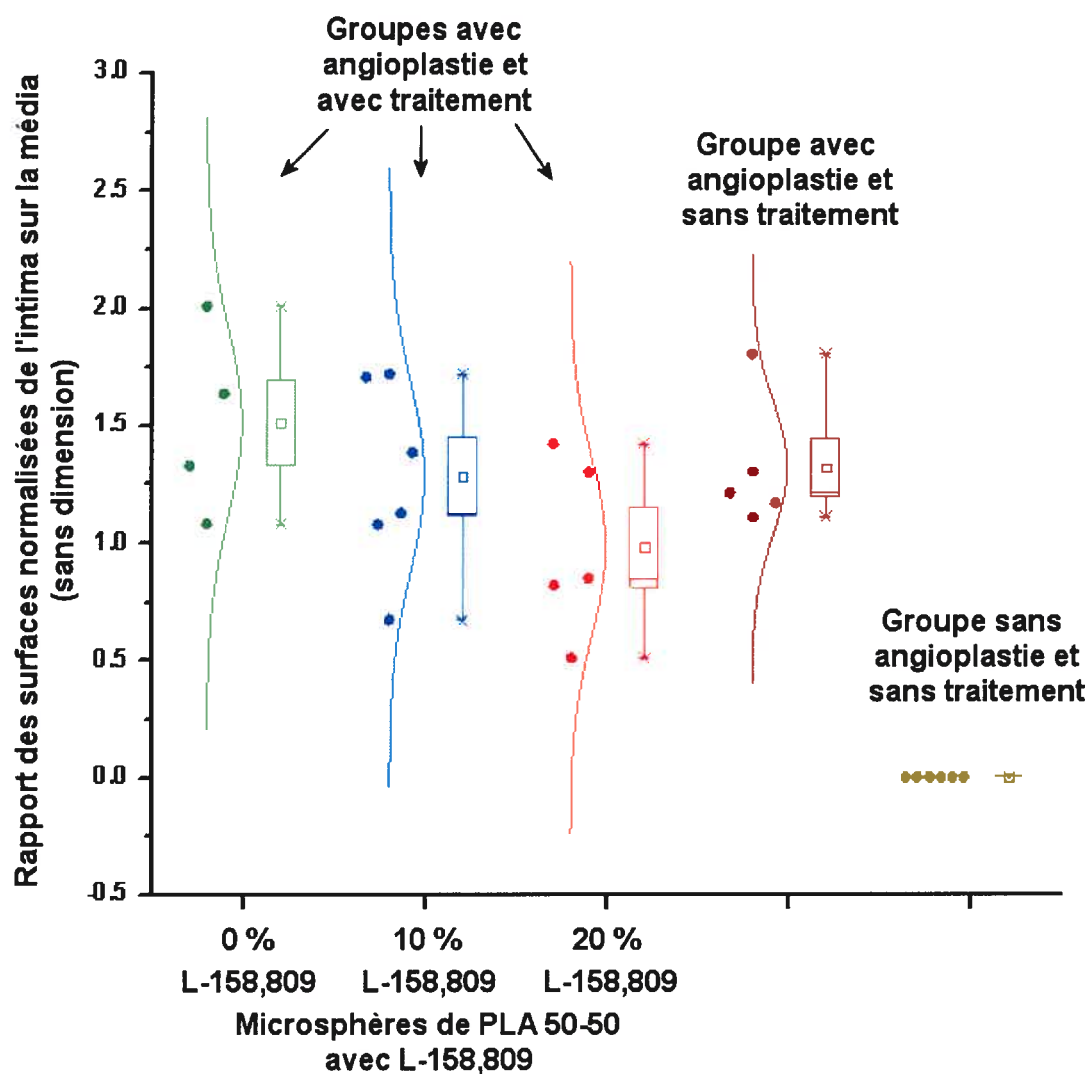


Figure IV - 3.1-4 Rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

IV - 3.1.1.1 Résultats statistiques de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces luminales normalisées, les proliférations néo-intimales normalisées et les rapports des surfaces normalisées des intimas sur médias, des différents groupes expérimentaux d'artères.

L'analyse de variance, à un caractère de classification ou à une dimension, a été réalisée entre les différents groupes expérimentaux de rats pour chacun des paramètres à l'étude, notamment la surface luminale normalisée (SN), la prolifération néo-intimale (PN) et le rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN).

Dans toutes les analyses statistiques ANOVA présentées, l'hypothèse nulle correspond à l'assertion suivante : “ Les moyennes de tous les groupes sont égales ” tandis que l'hypothèse alternative est la suivante : “ Les moyennes de un ou de plusieurs groupes sont différentes ”.

Le Tableau IV – 3.1-1 montre le sommaire des statistiques de l'analyse ANOVA sur les surfaces luminales normalisées (SN), les proliférations néo-intimales (PN) et les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN) des différents groupes expérimentaux de rats, dans les études de l'administration péri-vasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec L-158,809. Les résultats de ce tableau indiquent que l'analyse ANOVA à une dimension, conduit au rejet de l'hypothèse nulle, au seuil de signification 0,05 pour le paramètre à l'étude (SN, PN et RN). En d'autres termes, cela veut dire qu'avec un seuil de risque de 5 %, les moyennes des populations sont significativement différentes pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN). Cependant, à cette étape, il n'est guère possible de conclure que toutes les moyennes, pour le paramètre à l'étude, diffèrent les unes des autres puisque l'hypothèse alternative signifie en fait qu'il pourrait exister une hétérogénéité au sein des différentes moyennes, au seuil de risque α de 5 %.

5 Groupes de rats	Quantité de L-158,809 microencapsulé dans les microsphères de PLA 50-50			Angioplastie et sans traitement (groupe D)	Sans angioplastie et sans traitement (groupe E)
	0% (groupe A _A)	10% (groupe B _A)	20% (groupe C _A)		
Effectifs de rat par groupe (n)	4	6	5	5	6
Moyennes :					
SN	0.437	0.458	0.607	0.394	0.728
PN	0.819	0.751	0.140	0.964	-1
RN	1.514	1.283	0.981	1.319	0
Écarts types :					
SN	0.065	0.112	0.070	0.027	0.049
PN	0.294	0.387	0.341	0.198	0
RN	0.400	0.405	0.374	0.280	0
Erreurs standards :					
SN	0.032	0.046	0.031	0.012	0.020
PN	0.147	0.158	0.152	0.089	0
RN	0.200	0.165	0.167	0.125	0
Analyse de variance à un caractère de classification					
Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Valeur de P
Modèle :					
SN	4	0.421	0.105	20.00	6.40 E-7
PN	4	14.764	3.691	47.53	3.12 E-10
RN	4	8.026	2.006	19.35	8.37 E-7
Erreur :					
SN	21	0.110	0.005		
PN	21	1.631	0.077		
RN	21	2.177	0.103		
Conclusion du test	Avec un seuil de risque de 5 % les moyennes des échantillons sont significativement différentes				

Tableau IV - 3.1-1 Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.

Puisque les deux principales hypothèses de base de l'analyse de la variance sont d'une part la normalité des distributions des résultats correspondant à une même modalité et d'autre part l'égalité de leurs variances à une valeur commune, autrement dit la stabilité des variances ou encore appelée homoscedasticité des variances, il devient important d'entreprendre un test pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN) afin d'évaluer cette stabilité des variances, la première hypothèse sur la normalité des distributions étant supposée admise. Le test choisi pour l'homoscedasticité des variances est le test de Levene, dont les résultats sont exprimés dans le Tableau IV – 3.1-2.

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Valeur de P
Modèle :					
SN	4	3.360 E-4	8.401 E-5	1.84	0.16
PN	4	0.056	0.014	1.87	0.15
RN	4	0.070	0.017	1.76	0.17
Erreur :					
SN	21	9.572 E-4	4.558 E-5		
PN	21	0.158	0.007		
RN	21	0.21	0.01		
Conclusion du test	Avec un seuil de risque de 5 %, les variations des échantillons ne sont pas significativement différentes				

Tableau IV - 3.1-2 Test de Levene dans l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.

Le test de Levene indique que les analyses de variance sont robustes par rapport à un écart ou risque α de 5 %, aux hypothèses du modèle théorique de l'analyse de variance. En d'autres termes, avec un seuil de signification de 0,05, il ne semble pas y avoir de différence significative dans les variances des populations pour chaque paramètre étudié.

(SN, PN et RN), autrement dit les variances des populations semblent significativement homogènes, au risque de 5 % de se tromper. Par conséquent, il n'est pas préjudiciable de procéder à l'analyse ANOVA à une dimension. Dès lors, il est aussi possible de rechercher par une analyse systématique, de comparaisons multiples des moyennes, pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN), celles qui diffèrent significativement les unes des autres.

Le Tableau IV – 3.1-3 montrent que les résultats des comparaisons multiples des moyennes, procédées par le test de Scheffé, sont similaires dans le cas des surfaces normalisées des lumières (SN) et des proliférations néo-intimales normalisées (PN), à l'exception de la comparaison des moyennes des PN du groupe ayant reçu 20% de L-158,809 (groupe C_A) versus le groupe sans angioplastie et sans traitement (groupe E).

Les résultats semblent indiquer une différence significative, au seuil de signification de 5 %, entre la moyenne du groupe avec angioplastie et sans traitement (groupe D) versus celle du groupe sans angioplastie et sans traitement (groupe E). Ainsi il semble que la procédure d'angioplastie ait conduit à la diminution significative de la surface de la lumière artérielle, autrement dit à la diminution significative du diamètre de la lumière artérielle, au seuil de signification de 5 %, au sein des artères endommagées (groupe D) versus des artères intactes (groupe E). Cette réduction du diamètre de la lumière pourrait être bien la conséquence d'une resténose post-angioplastie, qui a été développée au site de lésion artérielle puisqu'il semble que la procédure d'angioplastie ait conduit également à une augmentation significative de la prolifération néo-intimale au seuil de signification de 5 %, au sein des artères endommagées (groupe D) versus des artères intactes (groupe E).

De plus, il ne semble pas y avoir de différences significatives, au seuil de risque de 5 %, entre les moyennes des trois groupes suivants :

- Le groupe avec angioplastie et avec des microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809 (groupe A_A),
- Le groupe avec angioplastie et avec des microsphères de PLA 50-50 avec 10 % de L-158,809 (groupe B_A),
- Le groupe avec angioplastie et sans traitement (groupe D).

	SN	PN	RN
Différence significative à 0.05			
Groupe A_A 0 % de L-158,809			
versus B_A	Non	Non	Non
versus C_A	Oui	Oui	Non
versus D	Non	Non	Non
versus E	Oui	Oui	Oui
Groupe B_A 10 % de L-158,809			
versus C_A	Oui	Oui	Non
versus D	Non	Non	Non
versus E	Oui	Oui	Oui
Groupe C_A 20 % de L-158,809			
versus D	Oui	Oui	Non
versus E	Non	Oui	Oui
Groupe D angioplastie et sans traitement			
versus E sans angioplastie et sans traitement	Oui	Oui	Oui

Tableau IV - 3.1-3 Comparaisons multiples des moyennes par le test de Scheffé appliqué sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.

Ainsi, il semble que des microsphères de PLA 50-50, dépourvues ou avec 10 % de L-158,809, administrées par la voie périvasculaire, ne permettent pas d'obtenir d'une part une augmentation significative, au seuil de risque de 5 %, de la surface de la lumière artérielle et d'autre part une diminution significative, au seuil de risque de 5 %, de la prolifération néo-intimale, chez des rats ayant subi une angioplastie

Par contre, pour les paramètres étudiés SN et PN, il semble y avoir une différence significative, au seuil de risque de 5 %, entre la moyenne du groupe avec 20 % de L-158,809 (groupe C_A), versus celles des groupes suivants :

- Le groupe avec angioplastie et avec des microsphères de PLA 50-50- sans L-158,809 (groupe A_A),
- Le groupe avec angioplastie et avec des microsphères de PLA 50-50 avec 10 % de L-158,809 (groupe B_A),
- Le groupe avec angioplastie et sans traitement (groupe D).

De plus, dans le cas du paramètre SN, il ne semble pas y avoir une différence significative entre la moyenne du groupe avec 20 % de L-158,809 (groupe C_A), versus celle du groupe sans angioplastie et sans traitement (groupe E). En conséquence, ces résultats tendent à montrer que la dose de 20 % de L-158,809 microencapsulé dans des microsphères de PLA 50-50, administrée par la voie périvasculaire, semble permettre le rétablissement de la lumière artérielle, de manière significative au seuil de risque de 5 %.

Toutefois, dans le cas du paramètre PN, il resterait une différence significative, au seuil de risque de 5 %, entre la moyenne du groupe avec 20 % de L-158,809 (groupe C_A), versus celle du groupe sans angioplastie et sans traitement (groupe E). Ce résultat reste compréhensible dans la mesure où le groupe C_A (20 % de L-158,809) est un groupe dans lequel les rats ont subi une angioplastie. L'angioplastie aurait occasionné une resténose dont l'expression se traduit par une prolifération de la néo-intima. Malgré la dose de 20 % de L-158,809, une néo-intima demeurerait encore présente au sein des artères endommagées et l'expérience n'a cependant pas permis de mettre en évidence une disparition totale de la néo-intima puisqu'il semble subsister encore une différence significative de la prolifération néo-intimale, au seuil de risque de 5 %, au sein même des artères de rats avec angioplastie.

Dans le cas du paramètre RN, les résultats du Tableau IV – 3.1-3 montrent comme précédemment, qu'il y a une différence significative, au seuil de signification de 5 %, entre la moyenne des ratios des surfaces normalisées de l'intima sur la média, du groupe sans angioplastie et sans traitement (groupe E), et celles des groupes avec angioplastie (groupes A_A,

B_A, C_A, D), qu'ils soient avec ou sans traitement. Par conséquent, l'angioplastie semble conduire à une augmentation significative, au seuil de signification de 5 %, de la moyenne des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média, chez des rats appartenant aux groupes avec angioplastie, qu'ils soient avec ou sans traitement (groupes A_A, B_A, C_A, D). Cette augmentation significative, au seuil de signification de 5 %, serait le reflet d'une prolifération néo-intimale au sein des artères endommagées par l'angioplastie et donc un indice qu'une resténose a été développée au site de lésion artérielle.

Enfin, les résultats indiquent que pour tous les groupes avec angioplastie (groupes A_A, B_A, C_A, D) les moyennes des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média semblent ne pas différer significativement entre elles, au seuil de signification de 5 %. Par conséquent, les administrations périsvasculaires de L-158,809, aux doses 10 % et 20 %, ne permettraient pas de mettre en évidence une augmentation ou une diminution significative, au seuil de 5 %, des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média, chez des rats ayant subi une angioplastie, qu'ils soient avec ou sans traitement (groupes A_A, B_A, C_A, D). En d'autres termes, ces résultats semblent montrer qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence d'un remodelage vasculaire significatif, au seuil de signification de 5 %, au sein des artères, ayant subi une angioplastie, qu'ils soient avec ou sans traitement (groupes A_A, B_A, C_A, D).

Enfin à cet étape, il convient de se questionner sur l'aptitude d'avoir rejeté à bon escient l'hypothèse nulle, lorsque celle-ci est fausse. C'est pourquoi, un test de puissance du test ANOVA à une dimension a été effectué et dont les résultats sont affichés dans le Tableau IV – 3.1-4. Le risque de première espèce α (Alpha), qui représente la probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie, a été fixé à 5 %.

Le Tableau IV – 3.1-4 montre ainsi que la puissance du test, qui est la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle alors que l'hypothèse alternative est vraie, semble être 100 %. Cela signifie que le test ANOVA à un caractère de classification, appliqué pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN), entre les différents groupes expérimentaux de rats, serait très puissant.

Risque de première espèce ou Alpha	Taille de l'échantillon total	SN : Puissance du test ou P	PN : Puissance du test ou P	RN : Puissance du test ou P
0.05	26	1.00	1.00	1.00

Tableau IV - 3.1-4 Puissance du test de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 50-50, versus les groupes sans traitement, avec ou sans angioplastie.

En d'autres termes, ce test ANOVA à un caractère de classification, qui a été appliqué, a permis de déceler les différences réelles les plus petites, entre les différents groupes de rats, pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN), sans pour autant augmenter l'erreur de première espèce α , fixé à 0,05, c'est-à-dire sans pour autant augmenter ce seuil de signification (0,05) de la probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie.

Finalement, cette expérience semble vouloir mettre en évidence qu'il y a bien eu une libération *in vivo* du L-158,809 hors des microsphères de PLA 50-50, en particulier lorsque la dose du L-158,809 est de 20 %, puisqu'il a été possible de détecter des effets pharmacologiques significatifs du L-158,809, notamment une augmentation significative, au seuil de signification 0,05, de la surface normalisée de la lumière artérielle et une inhibition significative, au seuil de signification 0,05, de la prolifération néo-intimale normalisée chez des rats ayant subi une procédure d'angioplastie carotidienne.

De plus, le fait que cette expérience n'ait pas permis de détecter des effets pharmacologiques significatifs dans le cas de la dose de 10 % de L-158,809 microencapsulé, quant aux paramètres de la surface normalisée de la lumière artérielle, de la prolifération néo-intimale normalisée et du rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média, pourrait signifier non pas que la dose de 10 % de L-158,809 ait été libérée trop rapidement des microsphères de PLA 50-50, puisque 20 % de L-158,809 avaient permis la détection des effets

pharmacologiques significatifs, mais plutôt que la dose de 10 % ait été insuffisante pour permettre la détection des effets pharmacologiques du L-158,809.

IV - 3.1.2 Dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 60-40, avec L-158,809.

Comme précédemment, afin de mieux illustrer les proportions relatives des surfaces de coupes vasculaires entre elles, une représentation en perspective est présentée pour chaque groupe expérimental de rats dans la Figure IV-3.1-5.

Ainsi, cette figure présente les surfaces moyennes de l'intima, de la média et de la lumière artérielle pour les groupes de rats suivants :

- Groupe avec angioplastie et avec microsphères PLA 60-40 sans L-158,809 (A)
- Groupe avec angioplastie et avec microsphères PLA 60-40 contenant 10 % de L-158,809 (B)
- Groupe avec angioplastie et avec microsphères PLA 60-40 contenant 20 % de L-158,809 (C)

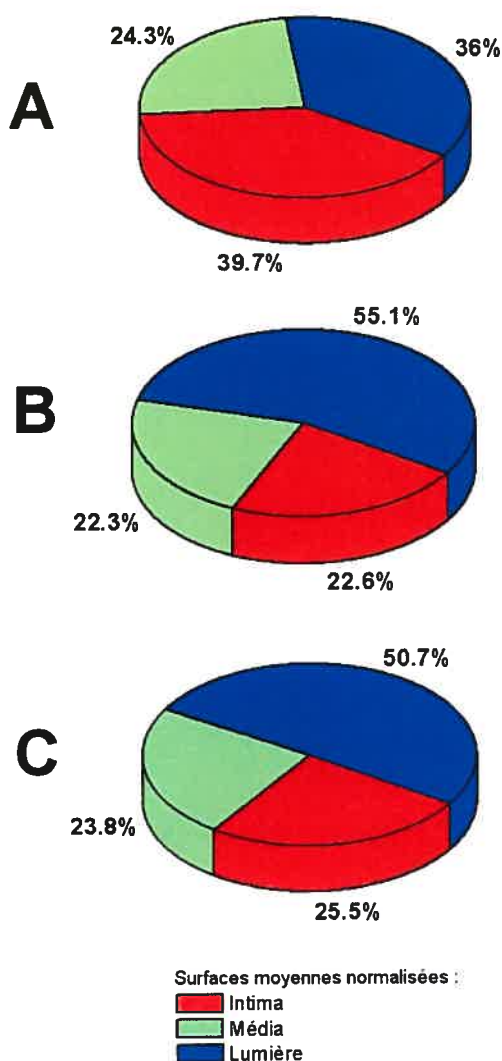


Figure IV - 3.1-5 Surfaces moyennes normalisées de l'intima, média et lumière artérielle de trois groupes de rats : le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 60-40 sans L-158,809 microencapsulé (**A**) (n = 5); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 60-40 contenant 10 % L-158,809 (**B**) (n = 5); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 60-40 contenant 20 % L-158,809 (**C**) (n = 6).

Précédemment, il a déjà été mentionné que la procédure d'angioplastie pouvait contribuer au développement d'une néo-intima au sein des artères lésées de rat.

Après un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 60-40, avec ou sans L-158,809, la surface intimale demeure encore présente : 39,7 % (A), 22,6 % (B) et 25,5 % (C). Dans une appréciation qualitative, il semble que la surface intimale tend à diminuer lorsque le L-158,809 est microencapsulé dans les microsphères, puisqu'elle passe de 39,7 % en absence de L-158,809 (A) à 22,6 % dans le cas de 10 % de L-158,809 (B) et à 25,5 % dans le cas de 20 % de L-158,809 (C).

De manière similaire, il semble que la surface luminale tende à augmenter lorsque le L-158,809 est microencapsulé dans les microsphères, puisqu'elle passe de 36 % en absence de L-158,809 (A) à 55,1 % dans le cas de 10 % de L-158,809 (B) et à 50,7 % dans le cas de 20 % de L-158,809 (C).

Par contre, les changements de la surface de la média ne semblent pas dépendre de la dose de L-158,809 microencapsulé puisque la surface de la média serait de 24,3 % en absence de L-158,809 (A) à 22,3 % dans le cas de 10 % de L-158,809 (B) et à 23,8 % dans le cas de 20 % de L-158,809 (C).

Les figures suivantes montrent pour chaque groupe expérimental de rats, dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809, les données relatives au paramètre à l'étude, c'est-à-dire la surface normalisée des lumières artérielles (Figures IV – 3.1-6), la prolifération néo-intimale (Figures IV – 3.1-7) et les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (Figures IV – 3.1-8).

Le choix des paramètres repose sur les mêmes considérations que celles du chapitre précédent.

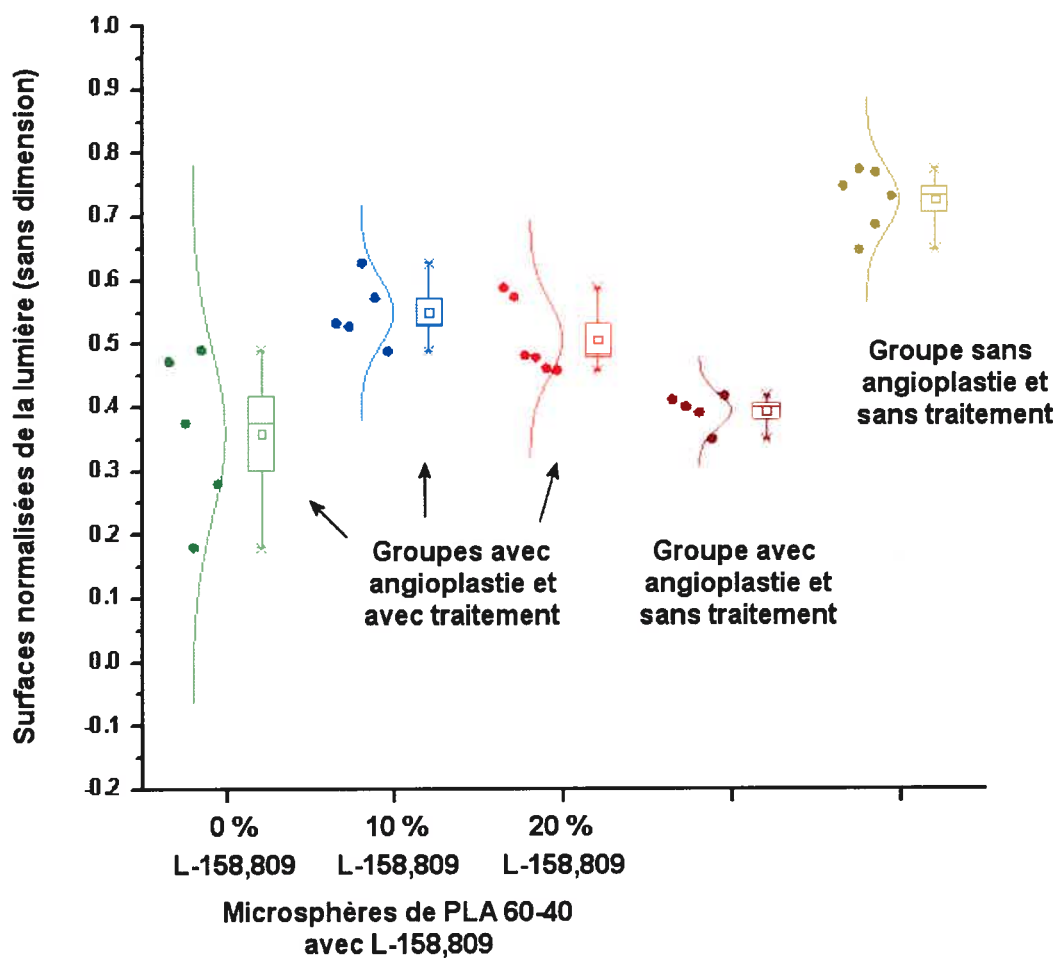


Figure IV - 3.1-6 Surfaces normalisées des lumières artérielles des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

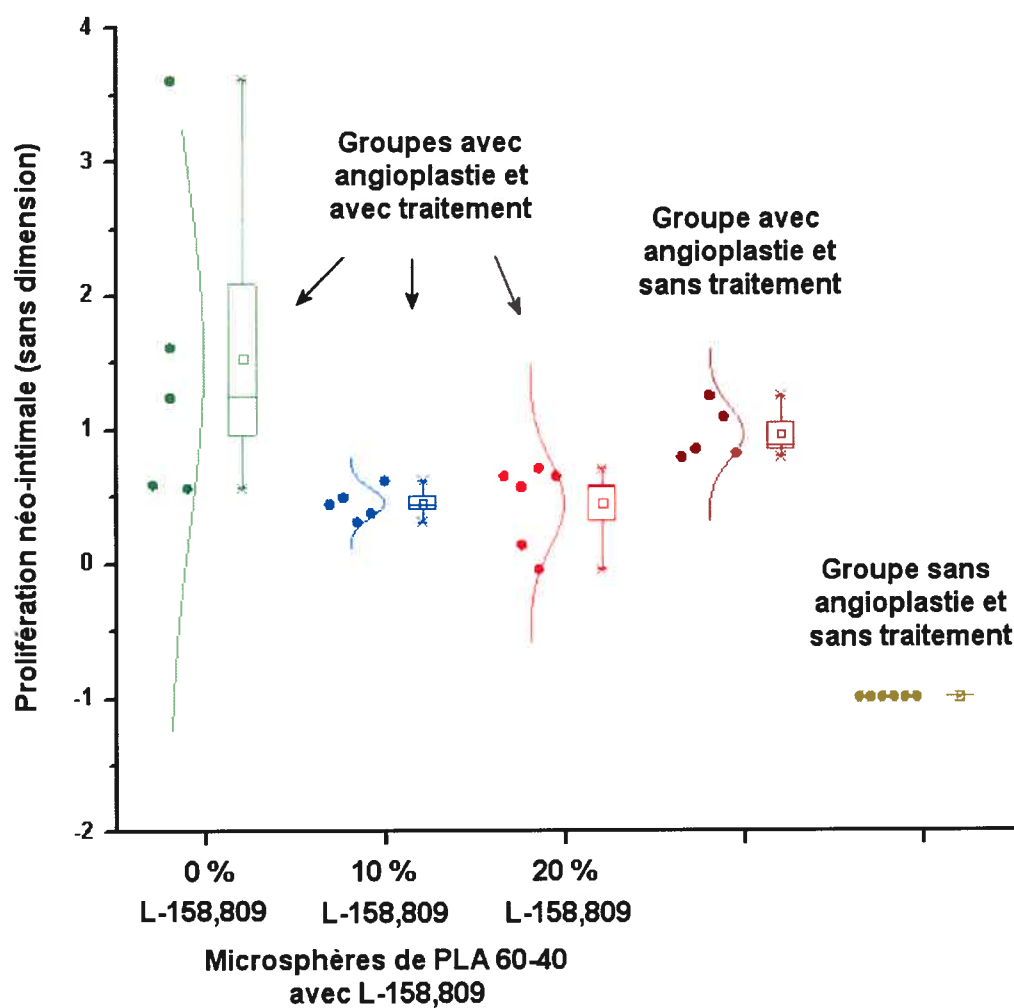


Figure IV - 3.1-7 Proliférations néo-intimales des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

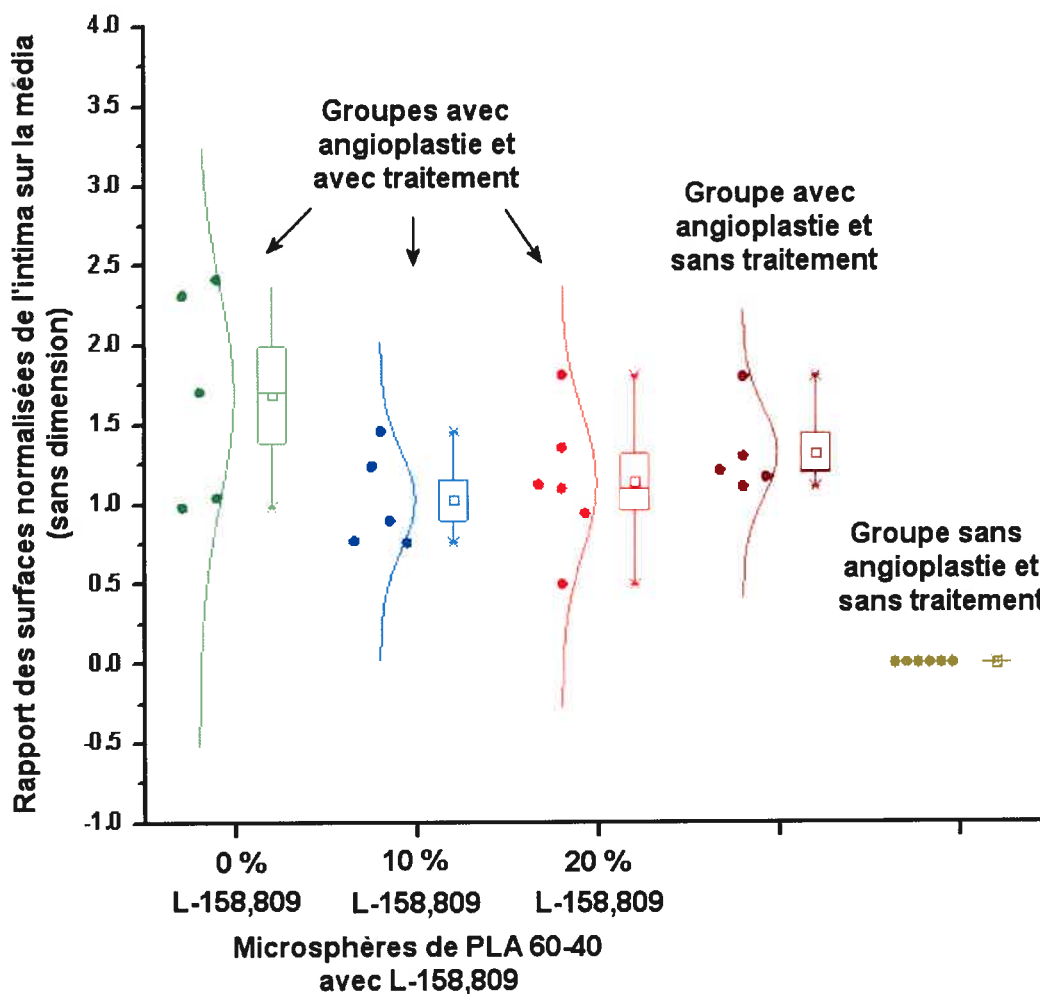


Figure IV - 3.1-8 Rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de l'administration périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

IV - 3.1.2.1 Résultats statistiques de l'analyse de variance à un caractère de classification sur les surfaces luminales normalisées, les proliférations néo-intimales normalisées et les rapports des surfaces normalisées des intimas sur médias des différents groupes expérimentaux d'artères.

L'analyse de variance, à un caractère de classification ou à une dimension, a été réalisée entre les différents groupes expérimentaux de rats pour chacun des paramètres à l'étude, notamment la surface luminale normalisée (SN), la prolifération néo-intimale (PN) et le rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN).

Comme dans le chapitre IV-3.1.1.1, pour toutes les analyses statistiques ANOVA présentées, l'hypothèse nulle correspond à l'assertion suivante : “ Les moyennes de tous les groupes sont égales ” tandis que l'hypothèse alternative est : “ Les moyennes de un ou de plusieurs groupes sont différentes ”. Le Tableau IV – 3.1-5 montre le sommaire des statistiques de l'analyse ANOVA sur les surfaces luminales normalisées (SN), les proliférations néo-intimales (PN) et les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN) des différents groupes expérimentaux de rats, dans les études de l'administration périsvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809.

L'analyse ANOVA à une dimension, conduit au rejet de l'hypothèse nulle, au seuil de signification 0,05 pour le paramètre à l'étude (SN, PN et RN). En d'autres termes, cela veut dire qu'avec un seuil de risque de 5 %, les moyennes des populations sont significativement différentes pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN). Comme dans le chapitre IV-3.1.1.1, à cette étape, il n'est guère possible de conclure que toutes les moyennes, pour le paramètre à l'étude, diffèrent les unes des autres puisque l'hypothèse alternative signifie en fait qu'il pourrait exister une hétérogénéité au sein des différentes moyennes, au seuil de risque α de 5 %.

4 Groupes de rats	Quantité de L-158,809 microencapsulé dans les microsphères de PLA 60-40			Angioplastie et sans traitement (groupe D)
	0% (groupe A _B)	10% (groupe B _B)	20% (groupe C _B)	
Effectifs de rats par groupe (n)	5	5	6	5
Moyennes :				
SN	0.36	0.550	0.507	0.394
PN	1.525	0.448	0.444	0.964
RN	1.693	1.025	1.136	1.319
Écarts types :				
SN	0.130	0.052	0.058	0.027
PN	1.252	0.118	0.319	0.198
RN	0.679	0.309	0.437	0.280
Erreurs standards :				
SN	0.058	0.023	0.024	0.012
PN	0.56	0.053	0.130	0.088
RN	0.304	0.138	0.178	0.125

Analyse de variance à un caractère de classification					
Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Valeur de P
Modèle :					
SN	3	0.126	0.042	7.2	0.002
PN	3	4.122	1.374	3.34	0.04
RN	3	1.310	0.437	2.12	0.13
Erreur :					
SN	17	0.099	0.006		
PN	17	6.993	0.411		
RN	17	3.499	0.206		
Conclusion du test	Aux seuil de risque de 5 % les moyennes des échantillons sont significativement différentes				

Tableau IV - 3.1-5 Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Comme dans le chapitre IV-3.1.1.1, le test de Levene d'homoscédasticité des variances a été effectué et les résultats du test sont exprimés dans le Tableau IV-3.1-6.

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Valeur de P
Modèle :					
SN	3	5.380 E-4	1.793 E-4	4.77	0.01
PN	22	5.584	1.861	2.43	0.10
RN	3	0.301	0.100	3.63	0.03
Erreur :					
SN	17	6.385 E-4	3.756 E-5		
PN	22	13.018	0.766		
RN	17	0.47	0.027		
Conclusion					
SN et RN : Aux seuils de risque de 5 %					
les variations des échantillons sont significativement différentes.					
PN : Aux seuils de risque de 5 %					
les variations des échantillons ne sont pas significativement différentes.					

Tableau IV - 3.1-6 Test de Levene dans l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Pour les paramètres SN et RN, au seuil de risque α de 5 %, les résultats du test de Levene semblent similaires alors que dans le cas du paramètre PN, il semble plutôt y avoir une divergence. Ainsi, les résultats du test de Levene semblent adopter l'hypothèse d'hétéroscédasticité, c'est à dire d'inégalité des variances, au seuil de signification de 0,05, pour les paramètres SN et RN. En d'autres termes, il y aurait une non-stabilité des variances dans l'ensemble des données relatives aux surfaces normalisées des lumières (SN) et dans l'ensemble des données relatives aux rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN). Ces constatations laisseraient penser, dans le cas de ces deux paramètres SN et RN, à la présence probable de variabilités dans des résultats d'une éventuelle analyse de variance ANOVA. Par conséquent, procéder à l'analyse ANOVA à une dimension pourrait faire ressortir des variabilités, des biais, voire des contradictions qui devraient se refléter dans les résultats, au seuil de risque de 5 %.

Par contre, dans le cas du paramètre PN, les résultats du test de Levene semblent reconnaître plutôt l'hypothèse d'homoscédasticité, c'est à dire d'homogénéité ou d'égalité des variances ce qui signifie que les différences entre les variances des populations seraient explicables par des fluctuations fortuites d'échantillonnage, au même seuil de signification. En d'autres termes, dans le cas du paramètre RN, il ne serait pas préjudiciable d'effectuer l'analyse de variance, au seuil de 5 %.

Malgré tout, comme les tests d'analyse de variance restent néanmoins robustes par rapport à un écart aux hypothèses du modèle théorique, il sera quand même procédé à une analyse systématique, de comparaisons multiples des moyennes, afin d'évaluer celles qui diffèrent significativement les unes des autres, sachant la présence possible de variabilités dans les résultats, notamment dans le cas des surfaces normalisées des lumières (SN) et dans le cas des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN).

Le Tableau IV – 3.1-7 montrent que les résultats des comparaisons multiples des moyennes, procédées par le test de Scheffé, sont similaires dans le cas des proliférations néo-intimales normalisées (PN) et dans le cas des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN). Les résultats pour ces deux paramètres, PN et RN, semblent montrer que les expériences de dépôt périvasculaire au moyen de microsphères nébulisées de PLA 60-40 contenant soit 0 %, soit 10 % ou soit 20 % de L-158,809 n'aient pas permis de détecter des différences significatives, au seuil de signification de 0,05, d'une part entre les trois groupes de rats ayant reçu des microsphères (A_B , B_B , C_B), comparés deux à deux, et d'autre part entre les mêmes trois groupes de rats ayant reçu des microsphères (A_B , B_B , C_B) versus le groupe de rat avec angioplastie et sans traitement de microsphères (D).

Dans le cas du paramètre de la surface normalisée luminale (SN), lorsque les microsphères de PLA 60-40 contiennent du L-158,809, il semble que des doses de 10 % et de 20 % de L-158,809 permettent de mettre en évidence une augmentation significative, au seuil de risque de 5 %, de la surface normalisée luminale chez des rats ayant reçu un dépôt périvasculaire de microsphères consécutif à une procédure d'angioplastie.

	SN	PN	RN
Différence significative à 0.05			
Groupe A_B 0 % de L-158,809			
versus B_B	Oui	Non	Non
versus C_B	Oui	Non	Non
versus D	Non	Non	Non
Groupe B_B 10 % de L-158,809			
versus C_B	Non	Non	Non
versus D	Oui	Non	Non
Groupe C_B 20 % de L-158,809			
versus D angioplastie et sans traitement	Non	Non	Non

Tableau IV - 3.1-7 Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Cependant cette observation doit être fortement nuancée puisqu'il semble que l'expérience n'ait pas permis de mettre en évidence une différence significative au seuil de signification 0,05 entre le groupe de rats avec angioplastie et traité au moyen des microsphères avec 20 % de L-158,809 (groupe C_B) versus le groupe de rat avec angioplastie mais sans traitement de microsphères (groupe D). De plus, bien qu'il ne semble pas y avoir de différence significative au seuil de signification 0,05 entre le groupe de rat traité avec 10 % de L-158,9809 (groupe B_B) versus le groupe de rat traité avec 20 % de L-158,9809 (groupe C_B), l'expérience n'a pas permis de mettre en évidence une relation transitive entre le groupe de rats traités avec 10 % de L-158,9809 (groupe B_B) et le groupe de rat avec angioplastie mais

sans traitement de microsphères (groupe D). En effet, il semble qu'il y ait une différence significative au seuil de signification 0,05 entre ces deux groupes de rats (groupe B_B versus groupe D).

En d'autres termes, il semble difficile d'affirmer que l'expérience de dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 60-40 avec L-158,809 soit suffisamment valide au point d'apprécier des différences significatives, au seuil de signification 0,05, entre les différents groupes de rat. Déjà le test de Levene effectué précédemment (Tableau IV-3.1-6) mettait en garde sur de possibles biais expérimentaux dans l'analyse de variance ANOVA à une dimension, des différents groupes de rats. En conséquence, la présence de biais expérimentaux auraient un impact non négligeable et contribueraient à la variabilité expérimentale observée dans les résultats.

Ainsi, plusieurs sources de biais peuvent être possibles. Il faut citer notamment :

- Le manque de précision dans la diffusion du médicament au site de lésion,
- La perte de principe actif dans le milieu interstitiel et extra-vasculaire,
- La libération trop rapide du principe actif au site de lésion, au lieu de s'effectuer progressivement sur quatorze jours.
- Le manque de précision dans le prélèvement des coupes d'artères car il pourrait y avoir une section de coupe effectuée à la limite, voire en dehors, du lieu de diffusion ou du site de lésion, au niveau artériel.
- Le possible remodelage vasculaire au niveau des artères lésées. Ce remodelage aurait pu contribuer, en particulier, à une variation négative du diamètre luminal des artères lésées du groupe avec 20 % de L-158,809 (groupe C_B).
- Un nombre insuffisamment élevé de rats par groupe

Par ailleurs, il est intéressant de noter que malgré le fait que les deux formulations de microsphères de PLA, c'est à dire la formulation de PLA 50-50 et celle de PLA 60-40, présentent des cinétiques de libération *in vitro* de L-158,809 similaires, pour une dose donnée, il semble qu'il n'y ait pas vraiment de corrélation évidente entre les expériences de cinétique de libération, effectuées *in vitro* et les expériences d'application, effectuées *in*

vivo, puisque les deux formulations de PLA semblent présenter des résultats qui divergent lorsque leur application est effectuée *in vivo*.

Enfin, le Tableau IV – 3.1-8 affiche la puissance du test ANOVA à une dimension, qui a été effectuée pour cette expérience. Le risque de première espèce α qui représente la probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie, est fixée comme précédemment à 5 %. Ce tableau montre que, lorsque le risque α est de 5 %, les puissances du test ANOVA à un caractère de classification, semblent moins élevées pour chacun des paramètres étudiés (SN, PN et RN) que celles de l'expérience de dépôt périvasculaire avec les microsphères de PLA 50-50 puisqu'elles semblent être ici de 94,8 % dans le cas des surfaces normalisées des lumières (SN), de 65,2 % dans le cas des proliférations néo-intimales normalisées (PN) et enfin de 44,7 % dans le cas des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN). Ainsi, la diminution des puissances du test ANOVA à un caractère de classification, suggère que, dans l'expérience de dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 60-40, des différences les plus petites entre les populations, sans augmenter l'erreur α de première espèce, n'ont pas toujours pu être décelées ce qui semble avoir probablement affecté les résultats.

Taille de l'échantillon total	Puissance du test au risque $\alpha = 0.05$ pour les paramètres :		
	SN	PN	RN
21	0.948	0.652	0.447

Tableau IV - 3.1-8 Puissance du test de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 microencapsulé dans du PLA 60-40, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

IV - 3.2 Étude de bi-médication par administration périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) avec L-158,809 et/ou Captopril.

Cette étude de bi-médication est surtout de nature exploratoire et a impliqué l'utilisation de L-158,809 et de Captopril. D'après les expériences précédentes avec les microsphères de PLA 50-50 et les microsphères de PLA 60-40, il est possible d'accepter maintenant que la procédure d'angioplastie employée, contribue bien au développement d'une néo-intima au sein des artères lésées de rat. De plus, il ne semblait pas y avoir de différences significatives au seuil de signification 0,05 entre les groupes de rats recevant les microsphères de PLA exemptes de L-158,809 et le groupe de rats avec angioplastie et sans dépôt de microsphères. En d'autres termes, les microsphères de PLA, exemptes de principe actif, ne semblaient pas avoir une activité inhibitrice sur l'hyperplasie néo-intimale. C'est pourquoi, de par sa nature exploratoire, cette étude de bi-médication a utilisé seulement les groupes de rats qui ont reçus soit le L-158,809, soit le Captopril ou soit ces deux principes actifs, afin de les comparer entre eux et évaluer le potentiel d'une approche par bi-médication.

Afin de mieux illustrer les proportions relatives des surfaces de coupes vasculaires entre elles, une représentation en perspective est présentée pour chaque groupe expérimental de rats dans la Figure IV-3.2-1.

Ainsi, cette figure présente les surfaces moyennes de l'intima, de la média et de la lumière artérielle pour les groupes de rats suivants :

- Groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de L-158,809 (A)
- Groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de Captopril (B)
- Groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril (C)

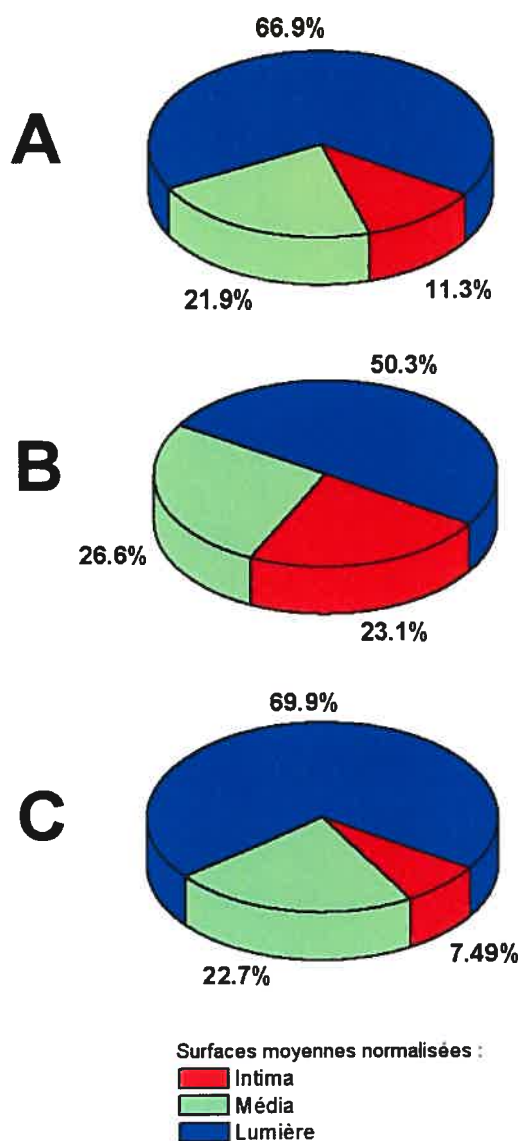


Figure IV - 3.2-1 Surfaces moyennes normalisées de l'intima, média et lumière artérielle de trois groupes de rats : le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de L-158,809 (**A**) (n = 5); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de Captopril (**B**) (n = 6); le groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA (66 815 PM) contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril (**C**) (n = 5).

La Figure IV-3.2-1 montre que la combinaison des deux médicaments microencapsulés dans des microsphères de PLA (66 815 PM), c'est-à-dire 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril réunis, semble avoir permis une diminution de la proportion moyenne relative de la néo-intima (C : Surface moyenne intimale de 7,49 %) et une augmentation de celle de la lumière artérielle (C : Surface moyenne luminale de 69,9 %) comparativement aux résultats obtenus après dépôt périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) ne contenant qu'un seul principe actif, soit le L-158,809 (A : Surface moyenne intimale de 11,3 % - Surface moyenne luminale de 66,9 %) ou soit le Captopril (B : Surface moyenne intimale de 23,1 % - Surface moyenne luminale de 50,3 %). Quant à la surface normalisée de la média, elle ne semble pas varier ostensiblement puisqu'elle est de 21,9 % dans le cas du L-158,809 (A), de 26,6 % dans le cas du Captopril (B) et de 22,7 % dans le cas du L-158,809 et Captopril réunis (C).

Néanmoins, puisque ces valeurs ne représentent en fait que des moyennes, il a été important d'effectuer une analyse statistique des données obtenues par l'analyse de variance ANOVA à une dimension.

Les figures suivantes montrent pour chaque groupe expérimental de rats, dans l'étude de bimédication, les données relatives au paramètre à l'étude, c'est-à-dire la surface normalisée des lumières artérielles (Figures IV – 3.1-2), la prolifération néo-intimale (Figures IV – 3.1-3) et les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (Figures IV – 3.1-4) puis représentent ce paramètre sous la forme de points et sous la forme de « boîte à pattes ». Enfin, le choix des paramètres repose sur les mêmes considérations que celles des expériences précédentes.

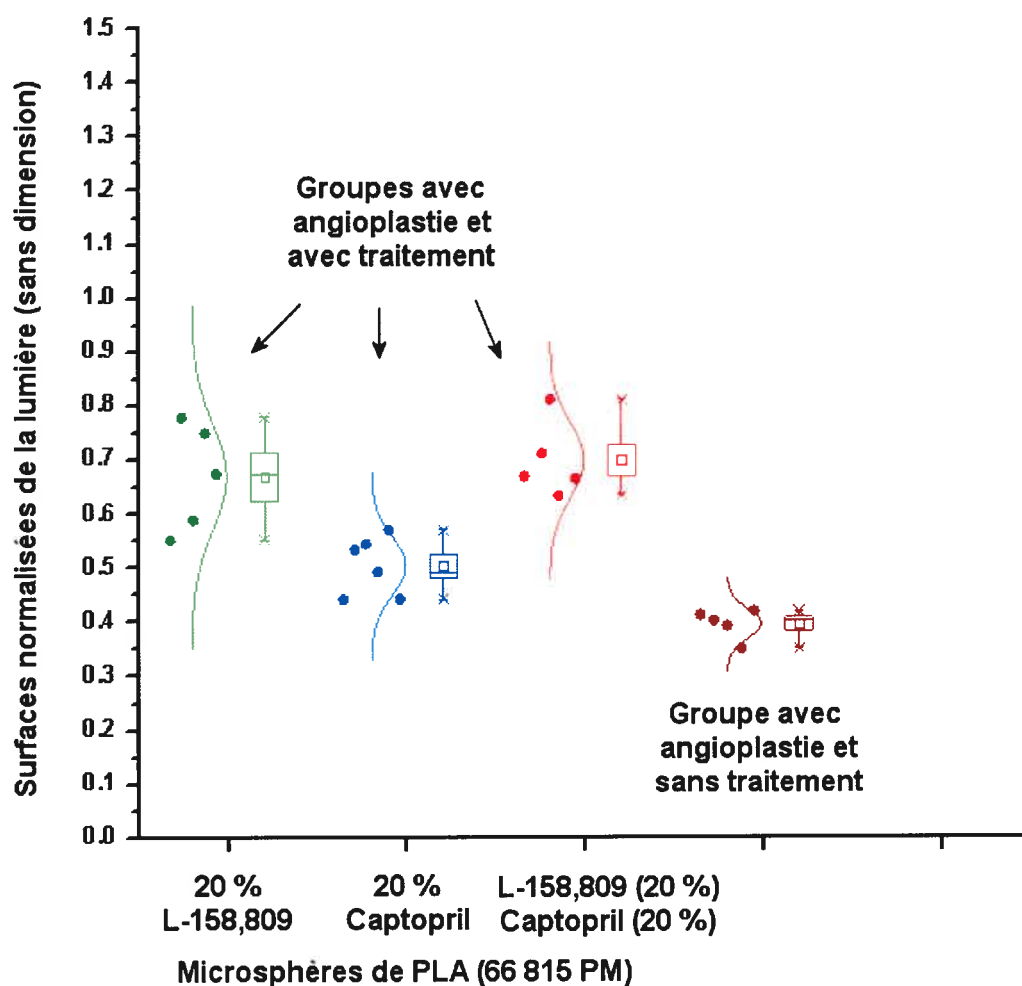


Figure IV - 3.2-2 Surfaces normalisées des lumières artérielles des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de bi-médication par l'administration périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) avec L-158,809 et/ou Captopril. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

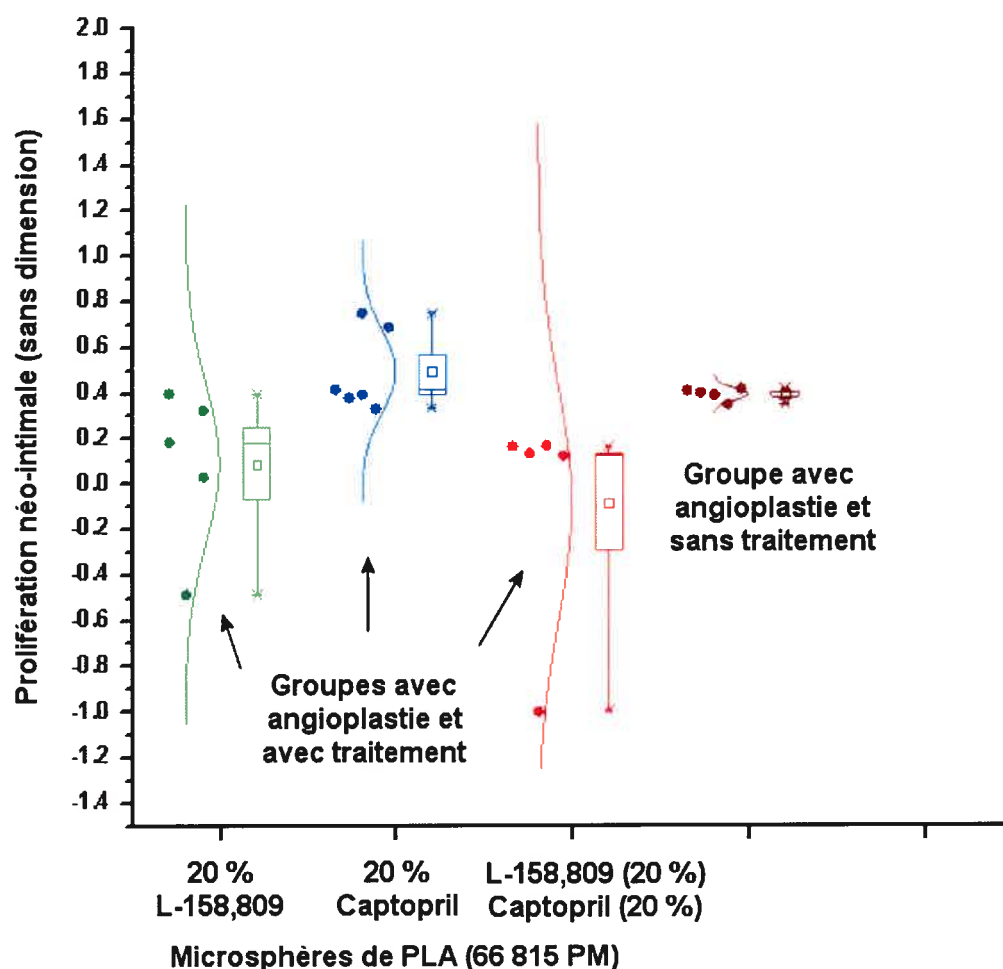


Figure IV - 3.2-3 Proliférations néo-intimales des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de bi-médication par l'administration périvasculaire de microsphères de PLA (66 815 PM) avec L-158,809 et/ou Captopril. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

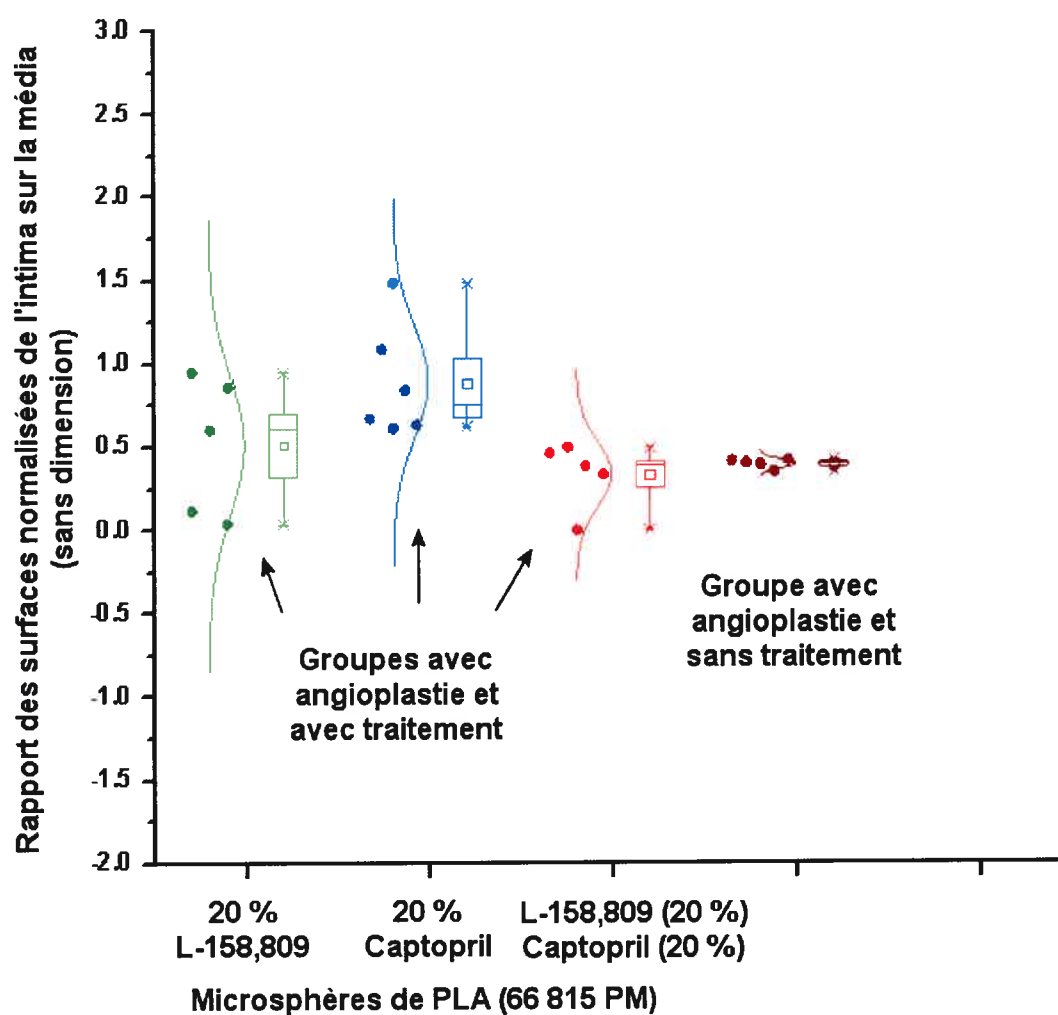


Figure IV - 3.2-4 Rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média des différents groupes expérimentaux de rats dans les études de bi-médication par l'administration périvasculaire de microsphères avec L-158,809 et/ou Captopril. L'effectif de rats pour chaque groupe est représenté par les points.

IV - 3.2.1 Résultats statistiques de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces luminales normalisées, les proliférations néo-intimales normalisées et les rapports des surfaces normalisées des intimas sur médias des différents groupes expérimentaux d'artères.

L'analyse de variance, à un caractère de classification ou à une dimension, a été réalisée entre les différents groupes expérimentaux de rats pour chacun des paramètres à l'étude, notamment la surface luminale normalisée (SN), la prolifération néo-intimale (PN) et le rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN).

Comme dans le chapitre IV-3.1.1.1, pour toutes les analyses statistiques ANOVA présentées, l'hypothèse nulle est : " Les moyennes de tous les groupes sont égales " tandis que l'hypothèse alternative est : " Les moyennes de un ou de plusieurs groupes sont différentes ".

Le Tableau IV – 3.2-1 montre le sommaire des statistiques de l'analyse ANOVA sur les surfaces luminales normalisées (SN), les proliférations néo-intimales (PN) et les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN) des quatre groupes expérimentaux de rats considérés dans cette étude de bimédication, l'administration des microsphères de PLA restant toujours périvasculaire.

L'analyse ANOVA à une dimension, conduit au rejet de l'hypothèse nulle, au seuil de signification 0,05 pour les paramètres à l'étude (SN, PN et RN). En d'autres termes, cela veut dire qu'avec un seuil de risque de 5 %, les moyennes des populations sont significativement différentes pour chaque paramètre étudié (SN, PN et RN). Comme dans les chapitres IV-3.1.1.1 et IV-3.1.2.1, à cette étape, il n'est guère possible de conclure que toutes les moyennes, pour le paramètre à l'étude, diffèrent les unes des autres puisque l'hypothèse alternative signifie en fait qu'il pourrait exister une hétérogénéité au sein des différentes moyennes, au seuil de risque α de 5 %.

4 Groupes de rats	Principe(s) actif(s) dans les microsphères			Angioplastie et sans traitement (groupe D)	
	20 % de L-158,809 (groupe A _C)	10 % de Captopril (groupe B _C)	20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril (groupe C _C)		
Effectifs de rats par groupe (n)	5	6	5	5	
Moyennes :					
SN	0.669	0.503	0.698	0.394	
PN	0.088	0.494	-0.082	0.964	
RN	0.513	0.890	0.334	1.319	
Écart types :					
SN	0.098	0.054	0.068	0.027	
PN	0.351	0.177	0.513	0.198	
RN	0.418	0.338	0.197	0.280	
Erreurs standards :					
SN	0.044	0.022	0.031	0.012	
PN	0.157	0.072	0.229	0.089	
RN	0.187	0.138	0.088	0.125	
Analyse de variance à un caractère de classification					
Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Valeur de P
Modèle :					
SN	3	0.312	0.104	23.64	2.68 E-6
PN	3	3.274	1.091	9.96	5.06 E-4
RN	3	2.870	0.957	9.33	7.11 E-4
Erreur :					
SN	17	0.075	0.004		
PN	17	1.862	0.109		
RN	17	1.742	0.102		
Conclusion	Au seuil de risque de 5 %				
Du test	les moyennes des échantillons sont significativement différentes				

Tableau IV - 3.2-1 Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Comme dans les chapîtres IV-3.1.1.1 et IV-3.1.2.1, le test de Levene d'homoscédasticité des variances a été effectué et les résultats du test sont exprimés dans le Tableau IV-3.2-2

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur de F	Valeur de P
Modèle :					
SN	3	1.392 E-4	4.642 E-4	3.23	0.048
PN	3	0.115	0.0038	1.12	0.37
RN	3	0.032	0.011	1.2	0.34
Erreur :					
SN	17	2.440 E-4	1.436 E-5		
PN	17	0.578	0.034		
RN	17	0.154	0.009		
SN : Au seuil de risque de 5 %, les variations des échantillons sont significativement différentes.					
PN et RN : Au seuil de risque de 5 %, les variations des échantillons ne sont pas significativement différentes.					
Conclusion du test					

Tableau IV - 3.2-2 Test de Levene dans l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Pour les paramètre PN et RN, au seuil de risque α de 5 %, les résultats du test de Levene semblent similaires alors que dans le cas du paramètre SN, il semble plutôt y avoir une divergence. Ainsi, les résultats du test de Levene semblent adopter l'hypothèse d'hétéroscédasticité, c'est à dire d'inégalité des variances, au seuil de signification de 0,05, pour le paramètre SN. En d'autres termes, il y aurait une non-stabilité des variances dans l'ensemble des données relatives aux surfaces normalisées des lumières (SN). Ces constatations laisseraient penser, dans le cas de ce paramètre SN, à la présence probable de variabilités dans des résultats d'une éventuelle analyse de variance ANOVA. Par conséquent, procéder à l'analyse ANOVA à une dimension pourrait faire ressortir des

dispersions expérimentales, des biais, voire des contradictions qui devraient se refléter dans les résultats, au seuil de risque de 5 %.

Par contre, dans le cas des paramètres PN et RN, les résultats du test de Levene semblent reconnaître plutôt l'hypothèse d'homoscédasticité, c'est à dire d'homogénéité ou d'égalité des variances ce qui signifie que les différences entre les variances des échantillons seraient explicables par des fluctuations fortuites d'échantillonnage, au même seuil de signification. En d'autres termes, dans le cas des paramètres PN et RN, il ne serait pas préjudiciable d'effectuer l'analyse de variance, au seuil de 5 %.

Malgré tout, comme les tests d'analyse de variance restent néanmoins robustes par rapport à un écart aux hypothèses du modèle théorique, il sera quand même procédé à une analyse systématique, de comparaisons multiples des moyennes, afin d'évaluer celles qui diffèrent significativement les unes des autres, sachant la présence possible de variabilités dans les résultats, notamment dans le cas des surfaces normalisées des lumières (SN).

Le Tableau IV – 3.2-3 montrent que les résultats des comparaisons multiples des moyennes, procédées par le test de Scheffé, sont similaires dans le cas des proliférations néointimales normalisées (PN) et dans le cas des rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN). Les résultats pour ces deux paramètres (PN et RN) semblent montrer que les expériences de dépôt périvasculaire au moyen de microsphères nébulisées de PLA (66 815 PM), contenant soit 20 % de L-158,809 (groupe A_C), soit 20 % de Captopril (groupe B_C) ou soit les deux principes actifs (groupe C_C), n'ont pas permis de détecter des différences significatives, au seuil de signification de 0,05, entre ces trois groupes de rats ayant reçu des microsphères, comparés deux à deux.

Dans le cas du paramètre de la surface normalisée luminale (SN), il semble que la moyenne de la surface normalisée luminale diffère significativement, au seuil de risque de 5 %, entre le groupe de rats ayant reçu 20 % de L-158,809 (groupe A_C) et celui ayant reçu 20 % de Captopril (groupe B_C). Mais, il semble que la moyenne de la surface normalisée luminale ne diffère pas significativement, au seuil de risque de 5 %, entre le groupe de rats ayant reçu 20 % de L-158,809 (groupe A_C) et celui ayant reçu le L-158,809 et le Captopril réunis (groupe

C_C). De plus, il semble que la moyenne de la surface normalisée luminale diffère significativement, au seuil de risque de 5 %, entre le groupe de rats ayant reçu 20 % de Captopril (groupe B_C) et celui ayant reçu le L-158,809 et le Captopril réunis (groupe C_C).

	SN	PN	RN
Différence significative à 0.05			
Groupe A_C 20 % de L-158,809			
versus B_C	Oui	Non	Non
versus C_C	Non	Non	Non
versus D	Oui	Oui	Oui
Groupe B_C 20 % de Captopril			
versus C_C	Oui	Non	Non
versus D	Non	Non	Non
Groupe C_C 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril			
versus D angioplastie et sans traitement	Oui	Oui	Oui

Tableau IV - 3.2-3 Analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Par ailleurs, le fait d'administrer des microsphères contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril, réunis, à des rats (groupe C_C) semble permettre, de manière significative, au seuil de signification 0,05, d'augmenter la surface normalisée moyenne luminale (SN), de réduire la prolifération néo-intimale moyenne normalisée (PN) et enfin

de varier le rapport moyen des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), des artères abîmées par une angioplastie et non traitées (groupe D).

Mais il reste difficile de prétendre qu'une potentialisation des effets pharmacologiques du L-158,809 par le Captopril ait pu avoir lieu à cause des résultats relatifs au L-158,809 microencapsulé et à ceux relatifs au Captopril microencapsulé. En effet, il semble que le fait d'administrer 20 % de L-158,809 microencapsulé à des rats (groupe A_C) permet, de manière significative, au seuil de signification 0,05, d'augmenter la surface normalisée moyenne luminale (SN), de réduire la prolifération néo-intimale moyenne normalisée (PN) et enfin de varier le rapport moyen des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), des artères abîmées par une angioplastie et non traitées (groupe D). Mais par contre, il semble que des résultats inverses puissent être obtenus avec 20 % de Captopril microencapsulé (groupe B_C), puisqu'il semble, de manière significative, au seuil de risque α de 5 %, ne pas y avoir une augmentation de la surface normalisée moyenne luminale (SN), une réduction de la prolifération néo-intimale moyenne normalisée (PN) et enfin une variation du rapport moyen des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), des artères abîmées par une angioplastie et non traitées (groupe D). En d'autres termes, la présence de 20 % de Captopril microencapsulée en même temps que 20 % de L-158,809 ne semble pas avoir nécessairement potentialisée les effets pharmacologiques du L-158,809 relatifs à la surface normalisée moyenne de la lumière artérielle (SN), à la prolifération néo-intimale normalisée moyenne (PN) et à la variation du rapport moyen des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN).

Enfin, le Tableau IV – 3.2-4 affiche la puissance du test ANOVA à une dimension, qui a été effectué pour l'expérience de bimédication. Le risque de première espèce α est fixée comme précédemment à 5 %. Le Tableau IV – 3.2-4 montre que la puissance du test semble demeurer encore élevée, le risque α étant de 5 %. En d'autres termes, le test ANOVA à un caractère de classification, appliqué aux paramètres à l'étude (SN, PN, RN) serait très puissant, au seuil de risque étudié, au point d'avoir permis de détecter les différences les plus petites entre les groupes, sans pour autant augmenter l'erreur α de

première espèce. En d'autres termes, les résultats obtenus par l'analyse ANOVA à un caractère de classification semblent validés.

Taille de l'échantillon total	Puissance du test au risque $\alpha = 0.05$ pour les paramètres :		
	SN	PN	RN
21	1.000	0.989	0.985

Tableau IV - 3.2-4 Puissance du test de l'analyse de variance à un caractère de classification, sur les surfaces normalisées des lumières (SN), sur les proliférations néo-intimales normalisées (PN) et sur les rapports des surfaces normalisées de l'intima sur la média (RN), entre les groupes de rats, avec L-158,809 et/ou Captopril, microencapsulés, versus le groupe avec angioplastie et sans traitement.

Finalement cette expérience de bimédication tend à confirmer le résultat obtenu avec la dose de 20 % de L-158,809 microencapsulé dans des microsphères de PLA 50-50. En effet, dans le cas présent, le résultat semble mettre en évidence que la dose de 20 % de L-158,809 peut se libérer efficacement des microsphères au point de permettre la production des effets pharmacologiques significatifs, au seuil de signification 0,05, du L-158,809, puisqu'il y a une augmentation de la surface normalisée de la lumière, une inhibition de la prolifération néo-intimale normalisée et une variation du rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média, chez des rats dont les carotides ont subi une procédure d'angioplastie. Mais malgré la présence conjointe de Captopril microencapsulé en même temps que le L-158,809 dans les microsphères de PLA, un effet pharmacologique potentialisateur du Captopril vis à vis du L-158,809 n'a pu être mis en évidence.

IV - 3.3 Évaluations des coupes de carotides de rats dans les expériences *in vivo*.

Après avoir sacrifié les rats, il était important d'apprécier l'ensemble de la procédure d'angioplastie ainsi que les effets des implantations périvasculaires des microsphères de PLA, avec et sans médicament, sur la morphologie artérielle, en particulier sur l'hyperplasie néointimale en observant plusieurs coupes de carotide.

IV - 3.3.1 Évaluations des coupes de carotides de rats après dépôts périvasculaires de microsphères de PLA avec L-158,809

Afin d'apprécier l'aspect typique de la morphologie générale des carotides soumises à la procédure d'angioplastie, dans le cadre des expériences *in vivo* de dépôt périvascularaire des microsphères de PLA, plusieurs coupes artérielles ont été prélevées et photographiées.

Les coupes de carotides, les plus représentatives des morphologies types rencontrées, sont montrées dans les figures suivantes et sont issues, pour fins de simplification, de l'étude avec les microsphères de PLA 50-50 :

- La Figure IV-3.3-1 illustre une coupe de carotide du groupe témoin dont les rats n'ont pas subi de procédure d'angioplastie.
- La Figure IV-3.3-2 illustre une coupe de carotide du groupe dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie mais aucun dépôt périvascularaire de microsphères.
- La Figure IV-3.3-3 illustre une coupe de carotide du groupe, dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie et un dépôt périvascularaire de microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809.
- La Figure IV-3.3-4 illustre une coupe de carotide du groupe dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie et un dépôt périvascularaire de microsphères de PLA 50-50 avec 10 % de L-158,809.

- La Figure IV-3.3-5 illustre une coupe de carotide du groupe, dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie et un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 avec 20 % de L-158,809.

La Figure IV-3.3-1 montre bien qu'en l'absence de procédure d'angioplastie, les artères carotides des rats présentent une lumière, une média et une adventice, visibles. Il est intéressant de constater que l'intima n'est pas visible sur les artères carotides saines.

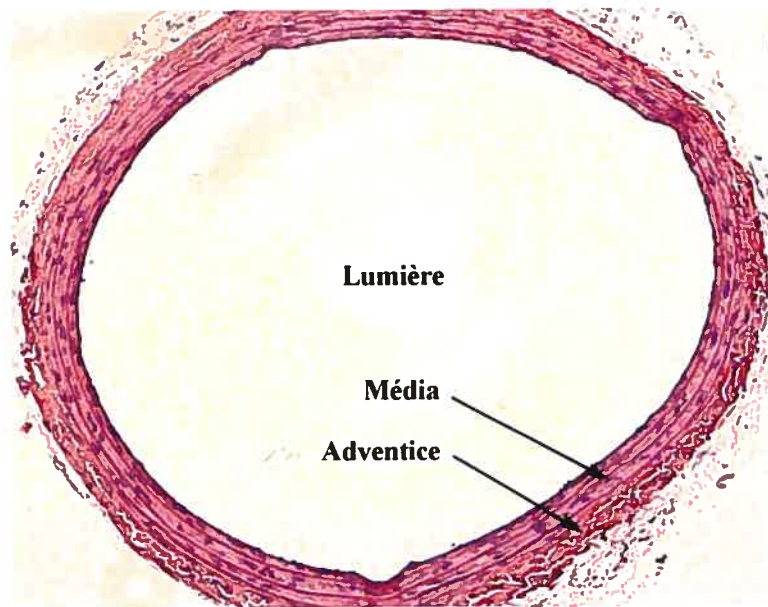


Figure IV - 3.3-1 Coupe de carotide de rat du groupe sans angioplastie et sans traitement (représentative pour n = 6 rats).

La Figure IV-3.3-2 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et sans traitement ultérieur, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice, visibles. Il est intéressant de constater qu'après 14 jours (journée de sacrifice des rats) suivant l'angioplastie, l'intima présente une phase d'hyperplasie néo-intimale très marquée.

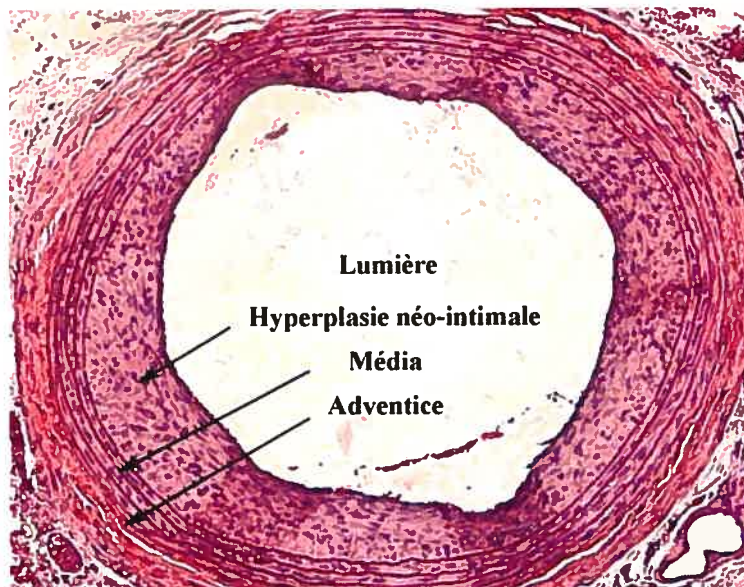


Figure IV - 3.3-2 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et sans traitement (représentative pour $n = 5$ rats).

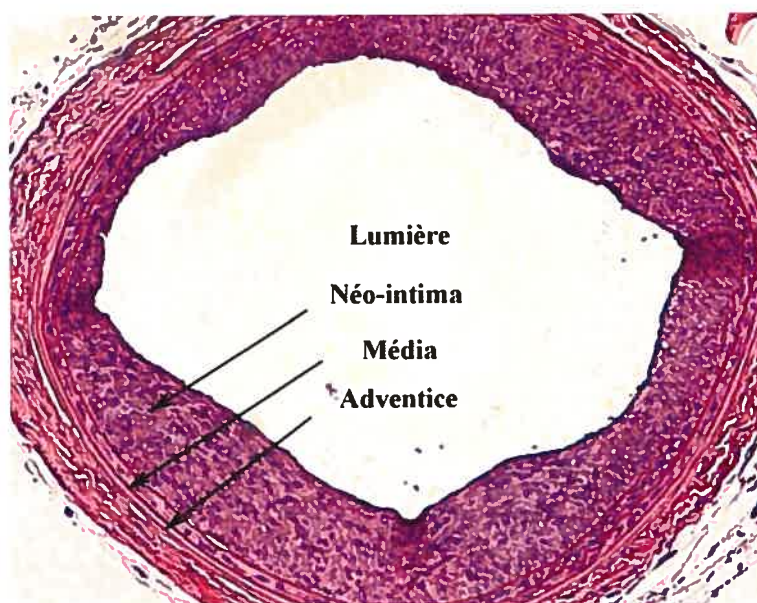


Figure IV - 3.3-3 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809 (représentative pour $n = 4$ rats).

La Figure IV-3.3-3 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et avec un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 sans L-158,809, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice, visibles. L'hyperplasie néo-intimale reste toujours marquée au niveau de la lésion artérielle.

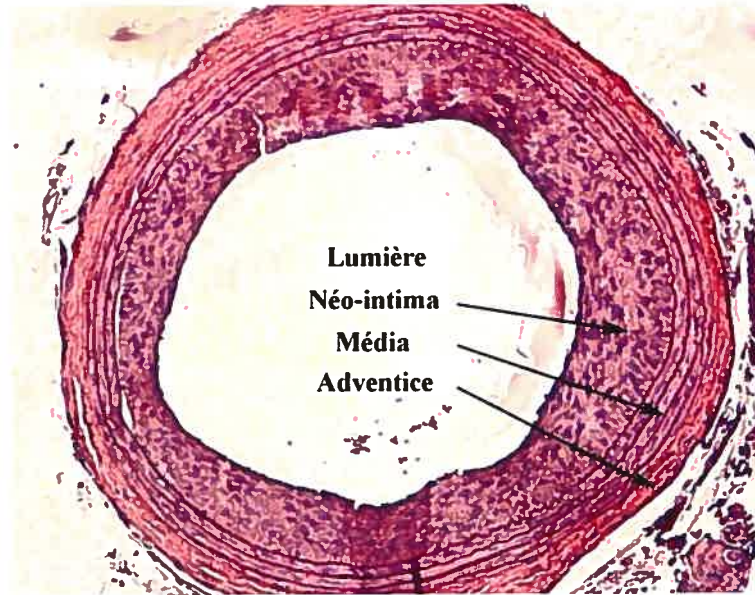


Figure IV - 3.3-4 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 10 % de L-158,809 (représentative pour n = 6 rats).

La Figure IV-3.3-4 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et avec un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 contenant 10 % de L-158,809, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice, visibles. L'hyperplasie néo-intimale reste encore présente au niveau de la lésion artérielle.

La Figure IV-3.3-5 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et avec un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 50-50 contenant 20 % de L-158,809, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice,

visibles. Bien que la néo-intima soit encore présente au niveau de la lésion artérielle, il est possible de remarquer l'augmentation du diamètre de la lumière qui semble avoir été restaurée significativement.

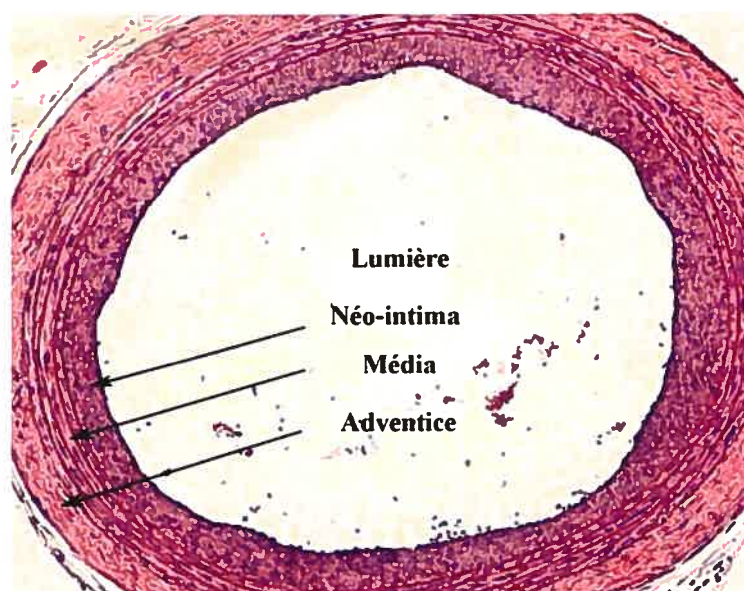


Figure IV - 3.3-5 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 50-50 contenant 20 % de L-158,809 (représentative pour n = 5 rats).

IV - 3.3.2 Évaluations qualitatives des coupes de carotides de rats dans l'étude sur la bimédication

Dans le cadre des expériences de bimédication *in vivo* de dépôt périvasculaire des microsphères de PLA 66 815 PM, plusieurs coupes artérielles ont aussi été prélevées et photographiées. Les coupes de carotides, les plus représentatives des morphologies types rencontrées, sont montrées dans les figures suivantes :

- La Figure IV-3.3-6 illustre une coupe de carotide du groupe, dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie et un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 66 815 PM avec 20 % de L-158,809.
- La Figure IV-3.3-7 illustre une coupe de carotide du groupe, dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie et un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 66 815 PM avec 20 % de Captopril.
- La Figure IV-3.3-8 illustre une coupe de carotide du groupe, dont les rats ont reçu une procédure d'angioplastie et un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 66 815 PM avec 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril.

La Figure IV-3.3-6 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et avec un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de L-158,809, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice, visibles. Dans cette situation, il est aisé de remarquer que la lumière artérielle est significativement élargie.

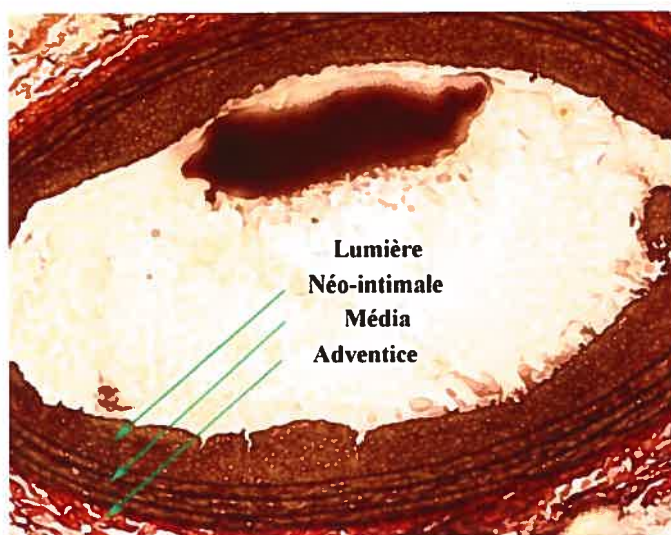


Figure IV - 3.3-6 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de L-158,809 (représentative pour n = 5 rats).

La Figure IV-3.3-7 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et avec un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de Captopril, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice, visibles.

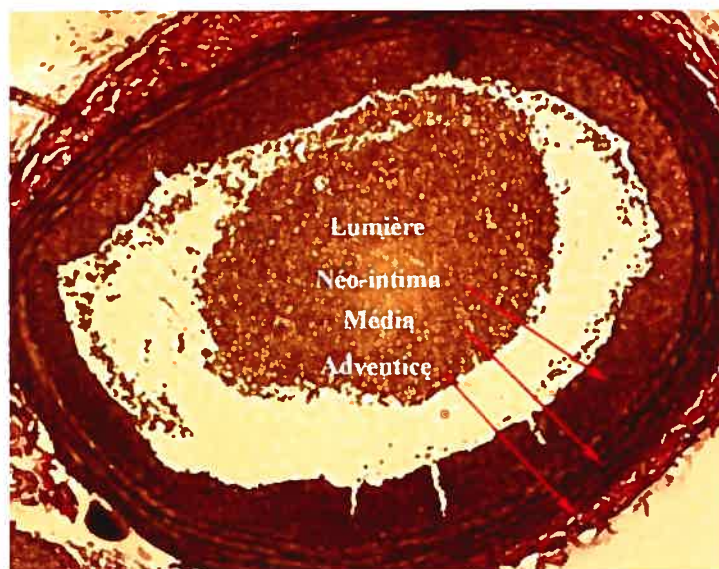


Figure IV - 3.3-7 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de Captopril (représentative pour n = 6 rats).

La Figure IV-3.3-8 montre qu'en présence d'une procédure d'angioplastie et avec un dépôt périvasculaire de microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril, les artères carotides des rats présentent une lumière, une néo-intima, une média et une adventice, visibles.

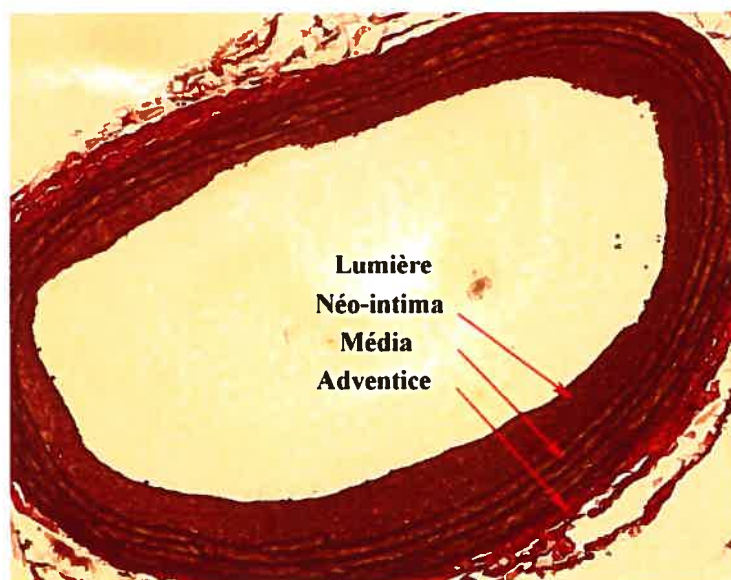


Figure IV - 3.3-8 Coupe de carotide de rat du groupe avec angioplastie et avec microsphères de PLA 66 815 PM contenant 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril (représentative pour n = 5 rats).

V Discussion générale et conclusion

Il y a des concepts qui ne traversent pas l'épreuve du temps sans en subir quelques profonds changements. Tel est celui de l'athérosclérose qui laissait à penser que l'obstruction des artères était le fait d'un problème de tuyauterie. Désormais, la participation de l'endothélium vasculaire aux processus d'athérogénèse, qui conduisent à la formation de la plaque d'athérome, n'est plus remise en question, d'autant plus qu'elle amène une vision plus appropriée du phénomène. Mais, l'ablation de la plaque n'est pas sans conséquence ultérieure puisqu'un phénomène de resténose se développe suite au traumatisme occasionné, par exemple par une procédure d'angioplastie au ballonnet, rendue nécessaire pour permettre le retrait de la plaque. Il se produit une hyperplasie néo-intimale, concomitant à un remodelage vasculaire, dont la finalité est une réduction de la lumière artérielle. Puisque l'adventice semble jouer un rôle indéniable dans le développement de la resténose, il est donc possible de recourir à la voie d'administration adventitielle pour y introduire un principe actif. Dès lors, il devenait important de choisir adéquatement la forme galénique la plus appropriée pour faciliter l'administration du principe actif, devant être déposé de façon périvasculaire en regard du site de la lésion artérielle.

Parmi l'éventail des formes galéniques disponibles, les microsphères polymériques nébulisées ont constitué un outil de vectorisation de choix. Ainsi, il a été possible de produire plusieurs catégories de microsphères polymériques, par nébulisation, dans le cadre de cette recherche. Les polymères typiques utilisés ont été l'acide polylactique (PLA) et l'acide poly-glycolique (PLGA). Plusieurs substances ont également été microencapsulées comme le L-158,809, le Captopril et la dexaméthasone. Il a également été possible d'inclure dans les microsphères, un excipient important, le PEG-1540 distéarate, dans le but de rendre furtives les microsphères aux macrophages.

La nébulisation a été une méthode judicieuse non seulement pour produire en quantité nécessaire et suffisante des microsphères mais également pour sa capacité à offrir

une grande efficacité de microencapsulation, puisque les résultats ont montré que cette efficacité pouvait dépasser le taux de 95 %.

L'analyse granulo-morphologique des microsphères a été effectuée à l'aide de trois techniques.

L'analyse par microscopie électronique a permis de constater que les microsphères nébulisées avaient une morphologie sphérique, avec une surface lisse parfois parsemée de légères dépressions donnant l'impression que le centre de particule serait moins dense par rapport à la surface. De plus, selon la microscopie électronique, le diamètre des microsphères ne semblait pas excéder 3 microns.

La spectroscopie de corrélation de photons a été suggérée dans l'espoir de mieux définir la taille de ces particules. Mais il a été difficile d'obtenir des résultats reproductibles dans la mesure où la présence d'agréations nuisait à la fiabilité des résultats. Par exemple, il a été possible d'observer pour les petits angles ($11,1^\circ$, $15,7^\circ$ et 23°) plusieurs populations distinctes de microsphères de taille différente dont la plus grande observée semblait être de 3 microns alors que pour les grands angles ($30,1^\circ$, $62,6^\circ$ et 90°) les tailles pouvaient atteindre 10 microns.

Une troisième étape devenait par conséquent nécessaire pour enfin garantir une meilleure caractérisation de la granulométrie et de la morphologie des microsphères. L'outil le plus approprié était incontestablement le microscope à force atomique (AFM) encore appelé microscope à champ proche. Au moyen de l'AFM, il a été désormais possible de caractériser précisément, en terme de données numériques, la morphologie des microsphères et leur granulométrie. Par leur grande précision, les images de la topographie des microsphères ont révélé que ces dernières étaient bien de morphologie sphérique, que leur taille ne dépassait pas trois microns, que leur surface était uniforme et lisse, malgré toutefois la présence de quelques collapses. Quant aux images AFM de phase des microsphères, elles confirmaient non seulement la topographie observée mais également permettaient de dire qu'il ne semblait pas y avoir d'hétérogénéité chimique dans toute la microsphère, autant en surface qu'à l'intérieur. Toutefois, il a été possible d'observer avec une grande précision la présence d'une recristallisation du L-158,809 à la surface des

microsphères de PLA avec PEG-1540 distéarate, placées en stabilité depuis plus de douze mois. Par ailleurs, ce puissant microscope a permis également de concrétiser pour la première fois une mesure plus appropriée de la complexité de la surface des microsphères, concrètement de leur état de rugosité. Ainsi, en appliquant une nouvelle méthode d'analyse fractale, notamment la relation entre la taille d'une surface et son RMS (écart moyen arithmétique), il était désormais possible de déterminer la dimension fractale de surface de plusieurs microsphères de manière rigoureuse, robuste et reproductible. Cette analyse fractale a aussi confirmé que la surface des microsphères était bien auto-affine et non auto-similaire. De plus, les résultats des analyses ont montré que toute variation de la topographie de la surface des microsphères affectait sans nul doute la dimension fractale de surface.

Dans la mesure où les microsphères étaient de nature polymérique, il était important de les caractériser au moyen de méthode thermique comme la thermogravimétrie à haute résolution et l'analyse enthalpique différentielle.

Les résultats des analyses de thermogravimétrie à haute résolution ont mis en évidence que lorsque les microsphères de PLA comportaient du Captopril, avec ou sans PEG-1540 distéarate, il était possible de différencier parfaitement tous les constituants mais que cela n'était plus le cas lorsque les microsphères comportaient du L-158,809, avec ou sans PEG-1540 distéarate. De plus, il est vite apparu une possibilité de quantifier des principes actifs microencapsulés dans la mesure où le composant majoritaire de la microsphère, par exemple le polymère PLA, se dégrade après le principe actif évalué. Cela était le cas du Captopril. Par contre, lorsque ce composant majeur se dégrade avant, le dosage du principe actif deviendrait imprécis. Tel était le cas du L-158,809.

D'après les résultats de l'analyse enthalpique différentielle (DSC), les microsphères polymériques exhibaient une température de transition vitreuse ainsi qu'une relaxation enthalpique au niveau de leur transition de phase. De plus, les résultats de DSC ont révélé que le L-158,809 et le Captopril étaient présents au sein des microsphères polymériques (polymère PLA) nébulisées, sous forme d'une dispersion solide moléculaire (et non pas sous la forme d'une dispersion particulaire cristalline) comme le confirmait l'absence du

pic de fusion des deux principes actifs. En conséquence, il était possible alors de penser que le principe actif microencapsulé était aussi uniformément réparti sur toute la surface des microsphères. Enfin, les résultats des DSC ont semblé montrer que le processus de nébulisation pourrait avoir densifié, voire compacter davantage les microsphères polymériques par rapport au polymère lui-même (non nébulisé).

L'étape suivante qui permettait de mieux caractériser chimiquement la surface des microsphères était sans en aucun doute la spectroscopie Raman. Cette technique s'est révélée indéniablement non destructive, fiable, précise et parfaitement adaptée au type d'échantillon constitué par les microsphères. Ainsi, des pics Raman du L-158,809 et du PLA ont pu être parfaitement identifiés à la surface des microsphères de PLA nébulisées, contenant du L-158,809. Par contre, lorsque les microsphères comportaient du PEG-1540 distéarate, il ne semblait pas possible de mettre en évidence des signaux Raman caractéristiques du PEG-1540 distéarate dans la mesure où ces derniers étaient masquées par les pics du principe actif et du PLA. Dans le cas du Captopril, il fallait atteindre une teneur de 35 % pour distinguer, avec assurance, ses pics Raman parmi ceux du PLA, à la surface des microsphères de PLA avec Captopril. En présence de PEG-1540 distéarate, les signaux correspondant à cet excipient étaient également masqués par ceux des autres constituants, PLA et Captopril. La dexaméthasone ainsi que le PLGA RG504 ont aussi été mis en évidence par leurs signaux Raman à la surface des microsphères les contenant.

Il a été possible également d'appliquer la spectroscopie Raman à l'évaluation et au contrôle de l'uniformité en principes actifs, notamment le L-158,809 et la dexaméthasone, à la surface des microsphères de PLA et de PLGA nébulisées. L'application potentielle de la méthode Raman pour contrôler quantitativement la présence de ces principes actifs dans les microsphères de PLA et de PLGA nébulisées a également été relevée.

Enfin, puisque le PEG-1540 distéarate avait été choisi comme excipient pour les expériences *in vivo*, les études de cinétiques de libération, *in vitro*, à partir des microsphères de PLA, du L-158,809 et du Captopril, en milieu aqueux de tampon phosphate à pH 7,4 et à 37 °C se révélaient rapides dans la mesure où cet excipient, dont le point de fusion était 45

°C, était soluble dans l'eau. Les études de libération *in vitro* de médicament ont permis cependant de s'assurer que le principe actif se libère bien des microsphères polymériques de PLA, complètement voire majoritairement en dedans de huit jours qui est le temps de développement et de mise en place d'une hyperplasie néo-intimale de la carotide chez le rat ayant subi une angioplastie carotidienne.

Toutes les microsphères de PLA avec un principe actif montraient un effet de libération rapide (*burst effect*), de plus de 45 % à 50 % (pour la dose de 10 % de L-158,809) et de plus de 60 % (pour la dose de 20 % de L-158,809), dès les premiers quinze minutes de leur immersion dans le bain de tampon phosphate. Cet effet de libération rapide, qui pourrait être dû à la présence de L-158,809 à la surface, voire proche de la surface, des microsphères de PLA, trouverait son explication d'une part dans les résultats des analyses thermiques enthalpiques différentielles et d'autre part dans les résultats des analyses par spectroscopie Raman. En effet, tandis que les résultats de la DSC mettaient en évidence l'état de dispersion moléculaire du principe actif réparti uniformément dans toutes les microsphères polymériques de PLA, les résultats des analyses par spectroscopie Raman démontraient l'uniformité chimique du principe actif à la surface des microsphères de PLA, avec ou sans PEG-1540 distéarate. Des microsphères de PLA (66 815 PM), sans PEG-1540 distéarate, avec 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril, microencapsulés ont également présenté un effet de libération rapide des principes actifs dès les premiers quinze minutes de leur immersion dans le bain de tampon phosphate (plus de 65 % dans le cas du L-158,809 et plus de 70 % dans le cas du Captopril).

De manière générale, les études de caractérisation *in vitro* des microsphères auront permis d'appliquer trois nouvelles technologies, le microscope à force atomique, le spectromètre Raman de dernière génération et l'appareil de thermogravimétrie à haute résolution, aux domaines des sciences pharmaceutiques. Il est fort à penser que la technologie avancée de ces appareils permettra sans aucun doute une meilleure caractérisation et compréhension plus poussée des outils de vectorisation pharmaceutique comme les systèmes microparticulaires polymériques. Par exemple, il serait intéressant d'explorer l'influence de plusieurs paramètres technologiques de fabrication sur l'état de

rugosité de la surface des microsphères, produites par nébulisation ou non, en utilisant les caractéristiques du microscope à champ proche en concomitance avec l'analyse fractale. Également, pourquoi ne pas développer d'autres approches mathématiques, dans l'univers des fractales, pour non seulement appréhender mais aussi vérifier leur application appropriée à l'étude de la rugosité de surface des systèmes microparticulaires. Enfin, indéniablement les options de phase du microscope AFM, encore peu connues et peu exploitées, devraient permettre d'apporter une meilleure vision des caractéristiques tant visco-élastiques que chimiques de la constitution des systèmes microparticulaires, chargés ou non en substances d'intérêt pharmaceutique, biopharmaceutique voire biomédicale. Quant au spectromètre Raman de dernière génération, il est fort probable qu'il deviendra un outil de choix pour les analyses pharmaceutiques, tant ses capacités sont encore peu exploitées. En outre, il serait intéressant dans l'avenir de contrôler les phénomènes de fluorescence, régulièrement rencontrés en spectroscopie Raman lorsque les échantillons sont d'origine biologique. Quant à la thermogravimétrie à haute résolution, il serait intéressant de développer plusieurs stratégies analytiques pour quantifier, au sein de microparticules, des substances d'intérêt, difficilement dosables par des méthodes conventionnelles,

Les vecteurs pharmaceutiques que constituent les microsphères nébulisées de PLA ont également été appliqués *in vivo* afin de connaître le potentiel de libération d'un médicament hors des microsphères. Pour cette démarche, le modèle de médicament choisi était le L-158,809 et le modèle de recherche *in vivo* approprié était l'inhibition de l'hyperplasie néo-intimale, après dépôt périvasculaire de L-158,809 microencapsulé dans du PLA avec PEG-1540 distéarate, dans des artères de rat, ayant subi une angioplastie. Deux formulations avaient été préparées, une formulation de PLA 50-50 et une formulation de PLA 60-40, contenant toutes les deux du PEG-1540 distéarate et du L-158,809, à la charge de 10 % ou à la charge de 20 %. Toutes considérations du protocole expérimental étant considérées, l'observation d'effets pharmacologiques significatifs, pour un seuil de signification choisi à 0,05, signifierait que le principe actif microencapsulé aurait bien été libéré des microsphères polymériques de PLA. Il n'a jamais été question dans cette

démarche de développer une formulation commercialement acceptable, ni même de trouver un traitement pharmacologique dans le but d'améliorer l'inhibition de la prolifération néo-intimale dans un cadre thérapeutique, puisque le domaine de cette recherche étant d'abord l'évaluation d'un outil de technologie pharmaceutique et non la pharmacologie.

Une libération *in vivo* du L-158,809 hors des microsphères de PLA 50-50, en particulier lorsque la dose du L-158,809 était de 20 %, a été mise en évidence par la détection des effets pharmacologiques significatifs du L-158,809, notamment une augmentation significative, au seuil de signification 0,05, de la surface normalisée de la lumière artérielle et une inhibition significative, au seuil de signification 0,05, de la prolifération néo-intimale normalisée chez des rats ayant subi une procédure d'angioplastie carotidienne et n'ayant reçu aucun traitement. Toutefois, il n'a pas été possible de mettre en évidence un remodelage vasculaire à partir des évaluations du rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média. De plus, le fait que cette expérience n'ait pas permis de détecter des effets pharmacologiques significatifs dans le cas de la charge de 10 % de L-158,809 microencapsulé, quant aux mêmes paramètres, signifierait non pas que la dose de 10 % de L-158,809 ait été libérée trop rapidement des microsphères de PLA 50-50, puisque 20 % de L-158,809 avaient permis la détection des effets pharmacologiques significatifs, mais plutôt que la charge de 10 % ait été insuffisante pour permettre la détection des effets pharmacologiques du L-158,809.

Lorsqu'il s'agissait de microsphères de PLA 60-40, la présence possible de biais expérimentaux contribuait à une grande variabilité expérimentale des résultats. Plusieurs sources de biais pouvaient être évoquées, comme un manque de précision dans la diffusion du médicament au site de lésion, une perte de principe actif dans le milieu interstitiel et extravasculaire, une libération trop rapide du principe actif au site de lésion, au lieu de s'effectuer progressivement sur quatorze jours, un manque de précision dans le prélèvement des coupes d'artères, un possible remodelage vasculaire au niveau des artères lésées, contribuant éventuellement à une variation négative du diamètre luminal des artères lésées et un effectif insuffisant de rat par groupe. Puisque les deux formulations de PLA ont donné des résultats divergeant *in vivo* alors que leurs cinétiques de libération *in vitro* de L-158,809 étaient

similaires, cela voulait dire qu'il n'y avait pas de corrélation évidente entre des études *in vitro* et des études *in vivo*.

Par la suite, une étude *in vivo* de bimédication par dépôt périvasculaire de microsphères, chargées de 20 % de L-158,809 et de 20 % de Captopril, était entreprise avec l'idée d'obtenir une potentialisation des effets pharmacologiques du L-158,809 par le Captopril. Malheureusement, il n'a pas été possible de mettre en évidence cette potentialisation à partir de l'évaluation des surfaces normalisées des lumières artérielles, de la prolifération néo-intimale normalisée et du rapport des surfaces normalisées de l'intima sur la média.

Enfin compte tenu des résultats *in vivo*, il pourrait être intéressant d'évaluer l'utilisation des microbilles polymériques, chargées avec différents principes actifs, sur d'autres animaux que les rongeurs, comme par exemple le cochon souvent utilisé comme modèle pour évaluer les stents. Bien que l'approche périvasculaire ait été utilisée dans le cadre de cette recherche, il serait intéressant dans l'avenir d'explorer l'administration des microsphères par la voie endoluminale au moyen d'un ballonnet microperforé.

VI Bibliographie

1. World Health Organization. (2004). The World Health Report 2004. Changing History. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. American Heart Association. (2004). Heart and Stroke Statistical - 2004 Update. American Heart Association, Dallas, Texas.
3. Williams, J. K. (1996). Les vasa vasorum des artères. *J. Mal. Vasc.*, 21, 266-269.
4. Stryer, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glagov, S., Insull, W. J., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1992). A definition of the intima of human arteries and its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85, 391-405.
5. Stryer, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W. J., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb.*, 14, 840-856.
6. Stryer, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W. J., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15, 1512-1531.
7. Florey, H. W. (1966). The endothelial cell. *Br. Med. J.*, 2, 487-489.
8. Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.
9. Corvol, P. (1993). L'endothélium, plaque tournante de la vasomotricité et de la trophicité de la paroi artérielle. *Médecine / Sciences*, 9, 1031-1033.
10. Corvol, P., Alhenc-Gelas, F. and Soubrier, F. (1993). L'endothélium, site de production et de métabolisme des peptides vasoactifs. *Médecine / Sciences*, 9, 1050-1060.

11. Gibbons, G. H. (1997). Endothelial function as a determinant of vascular function and structure : A new therapeutic target. *Am. J. Cardiol.*, 79, 3-8.
12. Bernier, S. G. and Guillemette, G. (1996). L'angiotensine IV : une nouvelle hormone du système rénine-angiotensine. *Médecine / Sciences*, 12, 609-613.
13. Beldent, V., Michaud, A., Wei, L., Chauvet, M. T. and Corvol, P. (1993). Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J. Biol. Chem.*, 268, 26428-26434.
14. Bénéteau-Burnat, B., Baudin, B., Morgant, G., Baumann, F. C. and Giboudeau, J. (1990). Serum angiotensin-converting enzyme in healthy and sarcoidotic children : comparison with the reference interval for adults. *Clin. Chem.*, 36, 344-346.
15. Mendelsohn, F. A. O., Lloyd, C. J., Kachel, C. and Funder, J. W. (1982). Induction by glucocorticoids of angiotensin-converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 70, 684-692.
16. Krulewitz, A. H., Baur, W. E. and Fanburg, B. L. (1984). Hormonal influence on endothelial cell angiotensin-converting enzyme activity. *Am. J. Physiol.*, 247, C-163-168.
17. Shunkert, H., Dzau, V. J., Tang, S. S., Hirsch, A. T., Apstein, C. S. and Lorell, B. H. (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload ventricular hypertrophy : effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *J. Clin. Invest.*, 86, 1913-1920.
18. Hirsch, A. T., Talsness, C. E., Shunkert, H., Paul, M. and Dzau, V. J. (1991). Tissue specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ. Res.*, 69, 475-482.
19. Shiota, N., Miyazaki, M. and Okunushi, M. (1992). Increase of angiotensin converting enzyme gene expression in the hypertensive aorta. *Hypertension*, 20, 168-174.
20. Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P. and Soubrier, F. (1990). An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.*, 86, 1343-1346.
21. Cambien, F., Alhenc-Gelas, F., Herbeth, B., Andre, J. L., Rakotovao, R., Gonzales, M. F., Allegrini, J. and Bloch, C. (1988). Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level : the Nancy study. *Am. J. Hum. Genet.*, 43, 774-780.
22. Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M. and Alhenc-Gelas, F. (1993). Angiotensin I - converting enzyme in human circulatory mononuclear cells. Genetic polymorphism in T-lymphocytes. *Biochem. J.*, 290, 33-40.

23. King, S. J. and Oparil, S. (1992). Converting-enzyme inhibitors increase converting enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 263, C743-749.
24. Roques, B. P., Noble, F., Dangi, F., Fournié-Zaluski, M.-C. and Beaumont, A. (1993). Neutral endopeptidase 24.11 : structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 45, 87-146.
25. Llorens-Cortes, C., Huang, H., Vicart, P., J.-M., G., Paulin, D. and Corvol, P. (1992). Identification and characterization of neutral endopeptidase in endothelial cells from venous or arterial origins. *J. Biol. Chem.*, 267, 14012-14018.
26. Sybertz, E. J., Chiu, P. J. S., Vemulapalli, S., Pitts, B. J. R., Watkins, R., Foster, C. J., Barnett, A. and Haslanger, M. F. (1989). SCH 39370, a neutral metalloendopeptidase inhibitor, potentiates biological responses to atrial natriuretic factor and lowers blood pressure in desoxycorticosterone acetate-sodium hypertension rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250, 624-631.
27. Pham, I., Gonzales, W., El Amrani, A. I. K., Fournié-Zaluski, M.-C., Philippe, M., laboulandine, I., Roques, B. P. and Michel, J. B. (1993). Effect of converting enzyme inhibitor and neutral endopeptidase inhibitor on renal function in experimental hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, 847-857.
28. Sakurai, T., Yanagisawa, M. and Masaki, T. (1992). Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 103-108.
29. Sokolovsky, M. (1992). Endothelins and sarafotoxins : physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmacol. Ther.*, 54, 129-149.
30. Lotersztajn, S. (1993). Les endothelines. *Médecine / Sciences*, 9, 1084-1093.
31. Ohnaka, K., Miyazaki, Y., Takada, J., Matsuyama, K., Yamaki, T. and Yano, M. (1990). Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17, 1192-1198.
32. Okada, K., Miyazaki, M., Takada, J., Matsuyama, K., Yamaki, T. and Yano, M. (1990). Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17, 1192-1198.
33. McMahon, E. G., Palomo, M. A., Moore, W. M. and Stern, M. K. (1991). Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) *in vivo* and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 703-707.

34. Sawamura, T., Kasuya, Y., Matsuhita, Y. and et al. (1991). Phosphoramidon inhibits the intracellular conversion of big endothelin-1 to big endothelin-1 in cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 779-784.
35. Davies, P. F. and Tripathi, S. C. (1993). Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ. Res.*, 72, 239-245.
36. Michel, J. B. and Arnal, J. F. (1993). Monoxyde d'azote et hypertension artérielle. *Médecine / Sciences*, 9, 1061-1067.
37. Ignarro, L. J. (1989). Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.*, 65, 1-21.
38. Loscalzo, J. and Welch, G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 38, 87-104.
39. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and et al. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 266, 4244-4250.
40. Moncada, S. and Vane, V. R. (1979). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.*, 30, 293-331.
41. Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium : interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 639-646.
42. Nakashima, M., Mombouli, J.-V., Taylor, A. A. and Vanhoutte, P.-M. (1993). Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J. Clin. Invest.*, 92, 2867-2871.
43. Hickey, K., Rubanyi, G., Paul, R. and Highsmith, R. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol.*, 248, C550-C556.
44. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415.
45. Masaki, T. (1993). Endothelins : homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocr. Rev.*, 14, 256-268.

46. Goto, K., Kasuya, Y., Matsuki, N., Takuwa, Y., Kurihara, H., Ishikawa, T., Kimura, S., Yanagisawa, M. and Masaki, T. (1989). Endothelin activates the dihydropyridine sensitive, voltage-dependent Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 3915-3918.
47. Godfraind, T., Mennig, D., Morel, N. and Wibo, M. (1989). Effect of endothelin-1 on calcium channel gating by agonists in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13, S112-S117.
48. Yang, Z., Bauer, E., Von Segesser, S. I., Stulz, P., Turina, M. and Lüscher, T. F. (1990). Different mobilization of calcium in endothelin-1 induced contractions in human arteries and veins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 16, 654-660.
49. Okamura, T., Okunishi, H., Ayajiki, K. and Toda, H. (1990). Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated renal artery : role of two different angiotensin II-generating enzymes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15, 353-359.
50. Ruschitzka, F. T., Noll, G. and Lüscher, T. F. (1997). The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology*, 88, 3-19.
51. Dzau, V. J. (1989). Short and long term determinants of cardiovascular function and therapy : Contributions of circulating and tissue renin-angiotensin systems. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 14, S1-S5.
52. Goodfriend, T. L., Elliott, M. E. and Catt, K. J. (1996). Angiotensin receptors and their antagonists. *N. Engl. J. Med.*, 334, 1649-1654.
53. Berry, C., Touyz, R., Dominiczak, A. F., Webb, R. C. and Johns, D. G. (2001). Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281, H2337-H2365.
54. De Plaen, J. F. (1998). Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II. *Louvain Medecine*, 117, S371-S376.
55. Guerci, B., Kearney-Schwartz, A., Böhme, P., Zannad, F. and Drouin, P. (2001). Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. *Diabetes Metab. (Paris)*, 27, 425-434.
56. Libby, P., Ridker, P. M. and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135 - 1143.
57. Li, A. C. and Glass, C. K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.*, 8, 1235-1242.

58. Dzau, V. J., Braun-Dullaeus, R. C. and Sedding, D. G. (2002). Vascular proliferation and atherosclerosis : New perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.*, 8, 1249-1256.
59. Dotter, C. T. and Judkins, M. P. (1964). Transluminal treatment of atherosclerotic obstruction : Description of a new technique and preliminary report of its application. *Circulation*, 30, 654-670.
60. Porstmann, W. A. (1973). A new corset balloon catheter for Dotter's transluminal recanalization with special reference to obliterations of the pelvic arteries. *Radiol. Diagn. (Berl)*. 14, 239-244.
61. Grüntzig, A. and Hopff, H. (1974). Percutaneous recanalization after chronic arterial occlusion with a new dilator-catheter (modification of the Dotter technique). *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 99, 2502-2510.
62. Hurst, J. W. (1986). The first coronary angioplasty as described by Andreas Gruentzig. *Am. J. Cardiol.*, 57, 185-186.
63. Maillard, L., Desveaux, B. and Quilliet, L. (1999). Angioplastie au ballonnet. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1539-1549.
64. Ryan, T. J., Bauman, W. B., Kennedy, J. W., Kereiakes, D. J., 3 rd. King, S. B., McCallister, B. D., Smith, S. C. and Ulliyot, D. J. (1993). Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American Heart Association/American College of Cardiology task force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures (committee on percutaneous transluminal coronary angioplasty). *Circulation*, 88, 2987-3007.
65. Anderson, W. D. and 3 rd. King, S. B. (1996). A review of randomized trials comparing coronary angioplasty and bypass grafting. *Curr. Opin. Cardiol.*, 11, 583-590.
66. Keenan, C. R. and Chou, T. M. (1998). Revascularization in coronary artery disease. *West. J. Med.*, 168, 280-285.
67. Steele, P. M., Chesebro, J. H., Stanson, A. W., Holmes, D. R. J., Dewanjee, M. K., Badimon, L. and Fuster, V. (1985). Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ. Res.*, 57, 105-112.
68. Wilentz, J. R., Sanborn, T. A., Haudenschild, C. C., Valeri, C. R., Ryan, T. J. and Faxon, D. P. (1987). Platelet accumulation in experimental angioplasty : time course and relation to vascular injury. *Circulation*, 75, 636-642.
69. Nurden, P., Ndoko, S. and Nurden, A. T. (2001). De la physiopathologie de la thrombose aux cibles thérapeutiques. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 94, 1210-1217.

70. Rockson, S. G., Lorenz, D. P., Cheong, W.-F. and Woodburn, K. W. (2000). Photoangioplasty : An emerging clinical cardiovascular role for photodynamic therapy. *Circulation*, 102, 591-596.
71. Barton, J., Nielsen, H., Rychnovsky, S., Farooq, M., Freischlag, J. and Grove, R. (2002). PhotoPoint photodynamic therapy inhibits intimal hyperplasia in arteriovenous access grafts. *Cardiovascular Radiation Medicine*, 3, 147-151.
72. Mintz, G. S., Popma, J. J., Pichard, A. D., Kent, K. M., Satler, L. F., Chuang, Y. C., DeFalco, R. A. and Leon, M. B. (1996). Limitations of angiography in the assessment of plaque distribution in coronary artery disease : A systematic study of target lesion eccentricity in 1446 lesions. *Circulation*, 93, 924-931.
73. Finet, G., Abrysch, F., Rioufol, G., Ohayon, J. and Lagache, M. (2000). Descriptions qualitatives et quantitatives des mécanismes d'action du ballon d'angioplastie sur la sténose coronaire. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 93, 1109-1117.
74. Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R. and Kolettis, G. J. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.*, 316, 1371-1375.
75. Holmes, D. R., Schwartz, R. S. and Webster, M. W. (1991). Coronary restenosis: what have we learned from angiography ?. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 17, 14B-22B.
76. Finet, G., Moll, T., Tabib, A. and et al. (1997). Analyse par les courbes ROC des performances d'interprétation en échographie endovasculaire. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 90, 59-66.
77. Tobis, J. M., Mallery, J. A., Gessert, J., Griffith, J., Mahon, D., Bessen, M., Moriuchi, M., McLeay, L., McRae, M. and Henry, W. L. (1989). Intravascular ultrasound cross-sectional arterial imaging before and after balloon angioplasty in vitro. *Circulation*, 80, 873-882.
78. Gussenhoven, E. J., Essed, C. E., Lancee, C. T. and al., e. (1989). Arterial wall characteristics determined by intravascular ultrasound imaging : An in vitro study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 14, 947-952.
79. Le Breton, H. (1999). Le diagnostic de la resténose. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1583-1587.
80. Linde, J. and Strauss, B. H. (2001). Pharmacological treatment for prevention of restenosis. *Expert Opinion. Emerging Drugs*, 6, 281-302.

81. Schwartz, R. S., Holmes, D. R. and Topol, E. J. (1992). The restenosis paradigm revisited : An alternative proposal for cellular mechanisms. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 20, 1284-1293.
82. Schwartz, R. S. (1998). Pathophysiology of restenosis : Interaction of thrombosis, hyperplasia, and / or remodeling. *Am. J. Cardiol.*, 81, 14E-17E.
83. Forrester, J. S., Fishbein, M., Helfant, R. and Fagin, J. A. (1991). A paradigm for restenosis based on cell biology : Clues for the development of new preventive therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 17, 758-769.
84. Rensing, B. J., Hermans, W. R. M., Beatt, K. J., Jan Laarman, G., Suryapranata, H., van der Brand, M., de Fester, P. J. and Serruys, P. W. (1990). Quantitative angiographic assessment of elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am. J. Cardiol.*, 66, 1039-1044.
85. Hanet, C., Wijns, W., Michel, X. and Schroeder, E. (1991). Influence of balloon size and stenosis morphology on immediate and delayed elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 18, 506-511.
86. Waller, B. F., Pinkerton, C. A., Orr, C. M., Slack, J. D., van Tassel, J. W. and Peters, T. (1991). Restenosis 1 to 24 months after clinically successful coronary balloon angioplasty : A necropsy study of 20 patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 17, 58B-70B.
87. Schwartz, S. M., Reidy, M. A. and O'Brien, E. R. (1995). Assessment of factors important in atherosclerotic occlusion and restenosis. *Thromb. Haemost.*, 74, 541-551.
88. Ross, R., Raines, E. W. and Bowen-Pope, D. F. (1986). The biology of platelet-derived-growth-factor. *Cell*, 46, 155-169.
89. Hughes, A. D., Clunn, G. F., Refson, J. and Demoliou-Mason, C. (1996). Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen. Pharmacol.*, 27, 1079-1089.
90. Mannaioni, P. F., Di Bello, M. G. and Masini, E. (1997). Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm. Res.*, 46, 4-18.
91. Battegay, E. J. (1995). Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.*, 73, 333-346.
92. Meurice, T., Bauters, C., Auffray, J.-L., Vallet, B., Hamon, M., Valero, F., van Belle, E., Lablanche, J. M. and Bertrand, M. E. (1996). Basic fibroblast growth factor restores

endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*, 93, 18-22.

93. Miano, J. M., Vlastic, N., Tota, R. R. and Stemerman, M. B. (1993). Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. *Arterioscler. Thromb.*, 13, 211-219.

94. Foegh, M. L. and Virmani, R. (1993). Molecular biology of intimal proliferation. *Curr. Opin. Cardiol.*, 8, 938-950.

95. Seidel, C. L. (1997). Cellular heterogeneity of the vascular tunica media : Implications for vessel wall repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 1868-1871.

96. Fuster, V., Falk, E., Fallon, J. T., Badimon, L., Chesebro, J. H. and Badimon, J. J. (1995). The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb. Haemost.*, 74, 552-559.

97. Fingerle, J., Johnson, R., Clowes, A. W., Majesky, M. W. and Reidy, M. A. (1989). Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 8412-8416.

98. Hamon, M., Bauters, C., Mc Fadden, E. P., Wernert, N., Lablanche, J. M., Dupuis, B. and Bertrand, M. E. (1995). Restenosis after coronary angioplasty. *Eur. Heart J.*, 16, 33-48.

99. Clyman, R. I., Mauray, F. and Kramer, R. H. (1992). Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp. Cell Res.*, 200, 272-284.

100. Liaw, L., Skinner, M. P., Raines, E. W., Ross, R., Cheresch, D. A., Schwartz, S. M. and Giachelli, C. M. (1995). The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha-5 beta-3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J. Clin. Invest.*, 95, 713-724.

101. Panda, D., Kundu, G. C., Lee, B. I., Peri, A., Fohl, D., Chackalaparampil, I., Mukherjee, B. B., Li, X. D., Mukherjee, D. C., Seides, S., Rosenberg, J., Stark, K. and Mukherjee, A. B. (1997). Potential roles of osteopontin and alphaVbeta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 9308-9313.

102. Dollery, C. M., Mc Ewan, J. R. and Henney, A. M. (1995). Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 77, 863-868.

103. Newby, A. C. and George, S. J. (1996). Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr. Opin. Cardiol.*, 11, 574-582.
104. Cleutjens, J. P. (1996). The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc. Res.*, 32, 816-821.
105. Clowes, A. W., Reidy, M. A. and Clowes, M. M. (1983). Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab. Invest.*, 49, 208-215.
106. Libby, P. and Tanaka, H. (1997). The molecular bases of restenosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 40, 97-106.
107. Lindner, V., Giachelli, C. M., Schwartz, S. M. and Reidy, M. A. (1995). A subpopulation of smooth muscle cells in injured rat arteries expresses platelet-derived growth factor-B chain mRNA. *Circ. Res.*, 76, 951-957.
108. Curfs, J. H., Meis, J. F. and Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 742-780.
109. McCaffrey, T. A., Consigli, S., Du, B., Falcone, D. J., Sanborn, T. A., Spokojny, A. M. and Bush, H. L. J. (1995). Decreased type II / type I TGF- β receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF- β 1. *J. Clin. Invest.*, 96, 2667-2675.
110. Riessen, R., Wight, T. N., Pastore, C., Henley, C. and Isner, J. M. (1996). Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 93, 1141-1147.
111. Schönherr, E., Jarvelainen, H. T., Kinsella, M. G., Sandell, L. J. and Wight, T. N. (1993). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.*, 13, 1026-1036.
112. Border, W. A. and Ruoslahti, E. (1992). Transforming growth factor-beta in disease : the dark side of tissue repair. *J. Clin. Invest.*, 90, 1-7.
113. Ju, H. and Dixon, I. M. (1996). Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can. J. Cardiol.*, 12, 1259-1267.
114. Sibinga, N. E., Foster, L. C., Hsieh, C. M., Perrella, M. A., Lee, W. S., Endege, W. O., Sage, E. H., Lee, M. E. and Haber, E. (1997). Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury. *Circ. Res.*, 80, 532-541.

115. Senior, R. M., Griffin, G. L., Mecham, R. P., Wrenn, D. S., Prasad, K. U. and Urry, D. W. (1984). Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J. Cell Biol.*, 99, 870-874.
116. Stamm, C., Sarret, Y., Schmitt, D. and Thivolet, J. (1992). Les Fibronectines. *Pathol. Biol.*, 40, 649-654.
117. Pakianathan, D. R. (1995). Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J. Leukoc. Biol.*, 57, 699-702.
118. Ribeiro, S. M., Poczatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M. and Murphy-Ullrich, J. E. (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.*, 274, 13586-13593.
119. O'Brien, E. R., Garvin, M. R., Stewart, D. K., Hinohara, T., Simpson, J. B., Schwartz, S. M. and Giachelli, C. M. (1994). Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb.*, 14, 1648-1656.
120. Srivatsa, S. S., Fitzpatrick, L. A., Tsao, P. W., Reilly, T. M., Holmes, D. R. J., Schwartz, R. S. and Mousa, S. A. (1997). Selective alpha-5 beta-3 integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury : evidence for the functional importance of integrin alpha-5 beta-3 and osteopontin expression during neointima formation. *Cardiovasc. Res.*, 36, 408-428.
121. Rosenberg, R. D., Shworak, N. W., Liu, J., Schwartz, J. J. and Zhang, L. (1997). Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated ?. *J. Clin. Invest.*, 99, 2062-2070.
122. Clowes, A. W., Clowes, M. M., Kocher, O., Ropraz, P., Chaponnier, C. and Gabbiani, G. (1988). Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J. Cell Biol.*, 107, 1939-1945.
123. Landzberg, B. R., Frishman, W. H. and Lerrick, K. (1997). Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 39, 361-398.
124. Wight, T. N., Kinsella, M. G. and Qwarnstrom, E. E. (1992). The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4, 793-801.

125. Rosenberg, R. D., Shworak, N. W., Liu, J., Schwartz, J. J. and Zhang, L. (1997). Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated ?. *J. Clin. Invest.*, 100, S67-S75.
126. Snow, A. D., Bolender, R. P., Wight, T. N. and Clowes, A. W. (1990). Heparin modulates the composition of the extracellular matrix domain surrounding arterial smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.*, 137, 313-330.
127. Finet, G. (1999). Échographie endocoronaire et angioplastie. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1681-1689.
128. Schwartz, R. S., Topol, E. J., Serruys, P. W., Sangiorgi, G. and Holmes, D. R. J. (1998). Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 32, 2087-2094.
129. Kakuta, T., Currier, J. W., Haudenschild, C. C., Ryan, T. J. and Faxon, D. P. (1994). Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation*, 89, 2809-2815.
130. Post, M. J., de Smet, B. J., van der Helm, Y., Borst, C. and Kuntz, R. E. (1997). Arterial remodeling after balloon angioplasty or stenting in an atherosclerotic experimental model. *Circulation*, 96, 996-1003.
131. Gibbons, G. H. and Dzau, V. J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.*, 330, 1431-1438.
132. Shi, Y., Pieniek, M., Fard, A., O'Brien, J., Mannion, J. D. and Zalewski, A. (1996). Adventitial Remodeling After Coronary Arterial Injury. *Circulation*, 93, 340-348.
133. Shi, Y., O'Brien, J. E., Fard, A., Mannion, J. D., Wang, D. and Zalewski, A. (1996). Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation*, 94, 1655-1664.
134. Shi, Y., O'Brien, J. E., Ala-Kokko, L., Chung, W., Mannion, J. D. and Zalewski, A. (1997). Origin of Extracellular Matrix Synthesis During Coronary Repair. *Circulation*, 95, 997-1006.
135. Zalewski, A. and Shi, Y. (1997). Vascular myofibroblasts : lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 417-422.
136. Fukumoto, Y., Shimokawa, H., Ito, A., Kadokami, T., Yonemitsu, Y., Aikawa, M., Owada, M. K., Egashira, K., Sueishi, K., Nagai, R., Yazaki, Y. and Takeshita, A. (1997).

Inflammatory cytokines cause coronary arteriosclerosis-like changes and alterations in the smooth-muscle phenotypes in pigs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29, 222-231.

137. Labinaz, M., Pels, H., C., Aggarwal, S. and O'Brien, E. R. (1999). Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Cardiovasc. Res.*, 41, 255-266.

138. Pels, K., Labinaz, M., Hoffert, C. and O'Brien, E. R. (1999). Adventitial angiogenesis early after coronary angioplasty : Correlation with arterial remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 229-238.

139. Bauters, C., van Belle, E., Mc Fadden, E., Lablanche, J. M. and Bertrand, M. E. (1999). La resténose après angioplastie. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1579-1582.

140. Schömig, A., Neumann, F. J., Walter, H., Schuhlen, H., Hadamitzky, M., Zitzmann-Roth, E. M., Dirschinger, J., Hausleiter, J., Blasini, R., Schmitt, C., Alt, E. and Kastrati, A. (1997). Coronary stent placement in patients with acute myocardial infarction: comparison of clinical and angiographic outcome after randomization to antiplatelet or anticoagulant therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29, 28-34.

141. Monassier, J. P., Hamon, M., Elias, J., Maillard, L., Spaulding, C., Raynaud, P., Cribier, A., Barragan, P., Juliard, J. M., Lefevre, T., Aubry, P., Faugier, J. P., Masquet, C., Rioux, P., Bedossa, M., Joly, P., Petiteau, P. Y., Royer, T., Morice, M. C., Roriz, R., Cattan, S., Meyer, P., Blanchard, D. and Khalife, K. (1997). Early versus late coronary stenting following acute myocardial infarction: results of the STENTIM I Study (French Registry of Stenting in Acute Myocardial Infarction). *Cathet. Cardiovasc. Diagn.*, 42, 243-248.

142. Serruys, P. W., De Jaegere, P., Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., Emanuelsson, H., Marco, J., Legrand, V., Materne, P., Belardi, J., Sigwart, U., Colombo, A., Goy, J. J., van den Heuvel, P., Delcan, J., Morel, M. A. and for the BENESTENT Study Group. (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 331, 489-495.

143. Fischman, D. L., Leon, M. B., Baim, D. S., Schatz, R. A., Savage, M. P., Penn, I., Detre, K., Veltri, L., Ricci, D. and Nobuyoshi, M. (1994). A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N. Engl. J. Med.*, 331, 496-501.

144. Serruys, P. W., van Hout, B., Bonnier, H., Legrand, V., Garcia, E., Macaya, C., Sousa, E., van der Giessen, W., Colombo, A., Seabra-Gomes, R., Kiemeneij, F., Ruygrok, P., Ormiston, J., Emanuelsson, H., Fajadet, J., Haude, M., Klugmann, S. and Morel, M. A. (1998). Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon

angioplasty in selected patients with coronary artery disease (BENESTENT II). [erratum appears in *Lancet* 1998 Oct 31;352(9138):1478.]. *Lancet*, 352, 673-681.

145. Eltchaninoff, H. (1999). Traitement curatif de la resténose. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1589-1593.

146. Hamon, M. and Grollier, G. (1999). Endoprothèses coronaires. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1551-1561.

147. Brasselet, C., Addad, F., Lemarchand, P. and Lafont, A. (1999). Traitement local lors de l'angioplastie. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 92, 1699-1706.

148. Lefkovits, J. and Topol, E. J. (1997). Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 40, 141-158.

149. Lincoff, A. M., Tcheng, J. E., Califf, R. M., Kereiakes, D. J., Kelly, T. A., Timmis, G. C., Kleiman, N. S., Booth, J. E., Balog, C., Cabot, C. F., Anderson, K. M., Weisman, H. F. and Topol, E. J. (1999). Sustained Suppression of Ischemic Complications of Coronary Intervention by Platelet GP IIb/IIIa Blockade With Abciximab : One-Year Outcome in the EPILOG Trial. *Circulation*, 99, 1951-1958.

150. Tcheng, J. E. (1997). Platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade: recent clinical trials in interventional cardiology. *Thromb. Haemost.*, 78, 205-209.

151. Faxon, D. P., Spiro, T. E., Minor, S., Cote, G., Douglas, J., Gottlieb, R., Califf, R., Dorosti, K., Topol, E. and Gordon, J. B. (1994). Low molecular weight heparin in prevention of restenosis after angioplasty. Results of Enoxaparin Restenosis (ERA) Trial. *Circulation*, 90, 908-914.

152. Gallo, R., Padurean, A., Toschi, V., Bichler, J., Fallon, J. T., Chesebro, J. H., Fuster, V. and Badimon, J. J. (1998). Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation*, 97, 581-588.

153. Barron, M. K., Lake, R. S., Buda, A. J. and Tenaglia, A. N. (1997). Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation*, 96, 3587-3592.

154. Liu, M. W., Roubin, G. S., Robinson, K. A., Black, A. J., Hearn, J. A., Siegel, R. J. and King, S. B. r. (1990). Tirofiban in preventing restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*, 81, 1089-1093.

155. Powell, J. S., Clozel, J. P., Muller, R. K., Kuhn, H., Hefti, F., Hosang, M. and Baumgartner, H. R. (1989). Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science*, 245, 186-188.

156. Clozel, J. P., Powell, J. S., Kuhn, H., Muller, R. K., Hefti, F. and Baumgartner, H. R. (1991). Vascular protection with cilazapril. *Drugs*, 41, 62-67.
157. Matsumoto, K., Morishita, R., Moriguchi, A., Tomita, N., Aoki, M., Sakonjo, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J. and Ogihara, T. (2001). Inhibition of neointima by angiotensin-converting enzyme inhibitor in porcine coronary artery balloon-injury model. *Hypertension*, 37, 270-274.
158. Yau, L., Wilson, D. P., Werner, J. P. and Zahradka, P. (2001). Bradykinin receptor antagonists attenuate neointimal proliferation postangioplasty. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281, H1648-H1656.
159. Kleemann, A., Eckert, S., von Eckardstein, A., Lepper, W., Schernikau, U., Gleichmann, U., Hanrath, P., Fleck, E., Neiss, A., Kerber, S., Assmann, G. and Breithardt and the CLAPT Study. (1999). Effects of lovastatin on progression of non-dilated and dilated coronary segments and on restenosis in patients after PTCA. The cholesterol lowering atherosclerosis PTCA trial (CLAPT). *Eur. Heart J.*, 20, 1393-1406.
160. Indolfi, C., Cioppa, A., Stabile, E., Di Lorenzo, E., Esposito, G., Pisani, A., Leccia, A., Cavuto, L., Stingone, A. M., Chieffo, A., Capozzolo, C. and Chiariello, M. (2000). Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 35, 214-221.
161. Tardif, J. C., Côté, G., Lespérance, J., Bourassa, M., Lambert, L., Doucet, S., Bilodeau, L., Nattel, S., De Guise, P. and the Multivitamins and Probucol Study Group. (1997). Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty: Multivitamins and Probucol Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 337, 365-372.
162. Côté, G., Tardif, J.-C., Lespérance, J., Lambert, J., Bourassa, M., Bonan, R., Gosselin, G., Joyal, M., Tanguay, J. F., Nattel, S., Gallo, R. and Crépeau, J. (1999). Effects of Probucol on Vascular Remodeling After Coronary Angioplasty. *Circulation*, 99, 30-35.
163. van der Hoeven, B. L., Pires, N. M. M., Warda, H. M., Oemrawsingh, P. V., van Vlijmen, B. J. M., Quax, P. H. A., Schalij, M. J., van der Wall, E. E. and Jukema, J. W. (2004). Drug-eluting stents: results, promises and problems. *Int. J. Cardiol.*, Article sous presse, disponible sur le site web en Juillet 2004. 9 pages.
164. van Belle, E., Rosey, G., Bauters, C. and Lablanche, J. M. (2004). Resténose et réponse de la paroi vasculaire après angioplastie : aspects physiopathologiques. *Pathol. Biol. (Paris)*. 52, 176-179.

165. Chevalier, B. (2004). Les stents actifs : enfin une prévention totale de la resténose ? *Pathol. Biol. (Paris)*, 52, 228-233.
166. Powell, J. S., Muller, R. K. M., Rouge, M., Kuhn, H., Hefti, F. and Baumgartner, H. R. (1990). The proliferative response to vascular injury is suppressed by angiotensin-converting enzyme inhibition. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 16, S42-S49.
167. Capron, L., Heudes, D., Chajara, A. and Bruneval, P. (1991). Effect of ramipril, an inhibitor of angiotensin converting enzyme, on the response of rat thoracic aorta to injury with a balloon catheter. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 18, 207-211.
168. Prescott, M. F., Webb, R. L. and Reidy, M. A. (1991). Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT1 receptor antagonist. Effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am. J. Pathol.*, 139, 1291-1296.
169. Taguchi, J., Abe, J., Okazaki, H., Ochiai, M., Ohno, M., Takuwa, Y. and Kurokawa, K. (1993). Angiotensin converting enzyme inhibitors or DuP753 prevent neointimal formation following balloon injury with single topical or multiple systemic application. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 969-974.
170. Clozel, J. P., Hess, P., Michael, C., Schietinger, K. and Baumgartner, H. R. (1991). Inhibition of converting enzyme and neointima formation after vascular injury in rabbits and guinea pigs. *Hypertension*, 18, II55-II59.
171. Lam, J. Y., Lacoste, L. and Bourassa, M. G. (1992). Cilazapril and early atherosclerotic changes after balloon injury of porcine carotid arteries. *Circulation*, 85, 1542-1547.
172. Churchill, D. A., Siegel, C. O., Moinor, S. T., West, M. S. and Raizner, A. E. (1993). Enalapril in the prevention of restenosis following intracoronary intervention in a swine model. *Coron. Artery Dis.*, 4, 461-467.
173. Huber, K. C., Schwartz, R. S., Edwards, W. D., Camrud, A. R., Bailey, K. R., Jorgenson, M. A. and Holmes, D. J. (1993). Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on neointimal proliferation in a porcine coronary injury model. *Am. Heart J.*, 125, 695-701.
174. Hanson, S. R., Powell, J. S., Dodson, T., Lumsden, A., Kelly, A. B., Anderson, J. S., Clowes, A. W. and Herker, L. A. (1991). Effects of angiotensin converting enzyme inhibition with cilazapril on intimal hyperplasia in injured arteries and vascular grafts in the baboon. *Hypertension*, 18, II70 - II76.

175. MERCATOR Study Group. (1992). Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty ? *Circulation*, 86, 100-110.
176. Faxon, D. P. and MARCATOR Study Group. (1995). Effects of high-dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis : Final results of the MARCATOR study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 25, 362-369.
177. Desmet, W., Vrolix, M., De Scheerder, I., Van Lierde, J., Willems, J. L. and Piessens, J. (1994). Angiotensin-converting enzyme inhibition with fosinopril sodium in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*, 89, 385-392.
178. Rakugi, H., Wang, D. S., Dzau, V. J. and Pratt, R. E. (1994). Angioplasty / Atherectomy. Potential importance of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition in preventing neointima formation. *Circulation*, 90, 449-455.
179. Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K. S., Bumpus, F. M. and Husain, A. (1990). Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J. Biol. Chem.*, 265, 22348-22357.
180. Okunishi, H., Oka, Y., Shiota, N., Kawamoto, T., Song, K. and Miyazaki, M. (1993). Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents. *Jpn. J. Pharmacol.*, 62, 207-210.
181. Farhy, R. D., Carretero, O. A., Ho, K. L. and Scicli, A. G. (1993). Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ. Res.*, 72, 1202-1210.
182. Allen, A. M., Zhuo, J. and Mendelsohn, F. A. O. (2000). Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens.*, 13, S31-S38.
183. Zhuo, J., Moeller, I., Trisha, J., Chai, S. Y., Allen, A. M., Ohishi, M. and Mendelsohn, F. A. O. (1998). Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J. Hypertens.*, 16, 2027-2037.
184. Chang, R. S., Siegl, P. K., Clineschmidt, B. V., Mantlo, N. B., Chakravarty, P. K., Greenlee, W. J., Patchett, A. A. and Lotti, V. J. (1992). In vitro pharmacology of L-158,809, a new highly potent and selective angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262, 133-138.
185. Siegl, P. K., Chang, R. S., Mantlo, N. B., Chakravarty, P. K., Ondeyka, D. L., Greenlee, W. J., Patchett, A. A., Sweet, C. S. and Lotti, V. J. (1992). In vivo pharmacology

of L-158,809, a new highly potent and selective nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262, 139-144.

186. Colletti, A. E. and Krieter, P. A. (1994). Disposition of the angiotensin II receptor antagonist L-158,809 in rats and rhesus monkeys. *Drug Metab. Dispos.*, 22, 183-188.

187. Mazighi, M., Tchétché, D., Hyafil, F. and Feldman, L. J. (2004). Thérapie génique des resténoses et de l'athérosclérose : espoirs et réalités. *Pathol. Biol. (Paris)*. 52, 212-217.

188. Baek, S. and March, K. L. (1998). Gene therapy for restenosis : Getting nearer the heart of the matter. *Circ. Res.*, 82, 295-305.

189. Kullo, I. J., Simari, R. D. and Schwartz, R. S. (1999). Vascular gene transfer : From bench to bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 196-207.

190. Metcalfe, B. L., Sellers, K. W., J.-R., J. M., Huentelman, M. J., Katovich, M. J. and Raizada, M. K. (2001). Gene therapy for cardiovascular disorders : Is there a future? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 953, 31-42.

191. Guzman, R. J., Hirschowitz, E. A., Brody, S. L., Crystal, R. G., Epstein, S. E. and Finkel, T. (1994). In vivo suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 10732-10736.

192. Asahara, T., Chen, D., Tsurumi, Y., Kearney, M., Rossow, S., Passeri, J., Symes, J. F. and Isner, J. M. (1996). Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation*, 94, 3291-3302.

193. Lundell, a., Kelly, A. B., Anderson, J., Marjjanowski, M., Rade, J. J., Hanson, S. R. and Harker, L. A. (1999). Reduction in Vascular Lesion Formation by Hirudin Secreted From Retrovirus-Transduced Confluent Endothelial Cells on Vascular Grafts in Baboons. *Circulation*, 100, 2018-2024.

194. Alt, E., Haehnel, I., Beilharz, C., Prietzel, K., Preter, D., Stemberger, A., Flidner, T., Erhardt, W. and Schömig, A. (2000). Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting : A new biodegradable stent coating releasing Hirudin and the Prostacyclin analogue Iloprost. *Circulation*, 101, 1453-1458.

195. Teirstein, P. S., Massullo, V., Jani, S., Popma, J. J., Mintz, G. S., Russo, R. J., Schatz, R. A., Guarneri, E. M., Steuterman, S., Morris, N. B., Leon, M. B. and Tripuraneni, P. (1997). Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N. Engl. J. Med.*, 336, 1697-1703.

196. Meerkin, D., Tardif, J.-C., Crocker, I. R., Arsenault, A., Joyal, M., Lucier, G., King III, S. B., Williams, D. O., Serruys, P. W. and Bonan, R. (1999). Effects of intracoronary β -radiation therapy after coronary angioplasty : An Intravascular ultrasound study. *Circulation*, 99, 1660-1665.
197. Teirstein, P. S. and Kuntz, R. E. (2001). New frontiers in interventional cardiology: intravascular radiation to prevent restenosis. *Circulation*, 104, 2620-2626.
198. Chorny, M., Fishbein, I. and Golomb, G. (2000). Drug delivery systems for the treatment of restenosis. *Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 17, 249-284.
199. Hill-West, J. L., Chowdhury, S. M., Slepian, M. J. and Hubbell, J. A. (1994). Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 5967-5971.
200. West, J. L. and Hubbell, J. A. (1996). Separation of the arterial wall from blood contact using hydrogel barriers reduces intimal thickening after balloon injury in the rat: the roles of medial and luminal factors in arterial healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 13188-13193.
201. Zarge, J. I., Huang, P., Husak, V., Kim, D. U., Haudenschild, C. C., Nord, R. M. and Greisler, H. P. (1997). Fibrin glue containing fibroblast growth factor type 1 and heparin with autologous endothelial cells reduces intimal hyperplasia in a canine carotid artery balloon injury model. *J. Vasc. Surg.*, 25, 840-848; discussion 848-849.
202. Zarge, J. I., Husak, V., Huang, P. and Greisler, H. P. (1997). Fibrin glue containing fibroblast growth factor type 1 and heparin decreases platelet deposition. *American Journal of Surgery*, 174, 188-192.
203. Slepian, M. J. (1994). Polymeric endoluminal paving. A family of evolving methods for extending endoluminal therapeutics beyond stenting. *Cardiol. Clin.*, 12, 715-737.
204. Slepian, M. J. (1996). Polymeric endoluminal gel paving: therapeutic hydrogel barriers and sustained drug delivery depots for local arterial wall biomanipulation. *Semin. Interv. Cardiol.*, 1, 103-116.
205. Peng, T., Gibula, P., Yao, K. and Goosen, M. F. A. (1996). Role of polymers in improving the results of stenting in coronary arteries. *Biomaterials*, 17, 685-694.
206. Bertrand, O. F., Sipehia, R., Mongrain, R., Rodes, J., Tardif, J. C., Bilodeau, L., Cote, G. and Bourassa, M. G. (1998). Biocompatibility aspects of new stent technology. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 32, 562-571.

207. Gunn, J. and Cumberland, D. (1999). Stent coatings and local drug delivery. *Eur. Heart J.*, 20, 1693-1700.
208. Serruys, P. W. and Kutryk, M. J. B. (1996). The state of the stent : Current practices, controversies, and future trends. *Am. J. Cardiol.*, 78, 4-7.
209. Beythien, C., Brockmann, M. A., Meinertz, T., Kühnl, P. and Gutensohn, K. (1999). Biocompatibility to reduce thrombogenicity of intracoronary stents. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine*, 26, 37-41.
210. Woods, T. C. and Marks, A. R. (2004). Drug-eluting stents. *Annu. Rev. Med.*, 55, 169-178.
211. Golomb, G., Mayberg, M. and Domb, A. J. (1994). Polymeric perivascular delivery systems. Polymeric site-specific pharmacotherapy, chap. 9, Ed. Domb, A. J., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, p. 205-219.
212. Okada, T., Bark, D. H. and Mayberg, M. R. (1988). Local anticoagulation without systemic effect using a polymer heparin delivery system. *Stroke*, 19, 1470-1476.
213. Golomb, G., Fishbein, I., Banai, S., Mishaly, D., Moscovitz, D., Gertz, S. D., Gazit, A., Poradosu, E. and Levitzki, A. (1996). Controlled delivery of a tyrphostin inhibits intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *Atherosclerosis*, 125, 171-182.
214. Nugent, H. M., Rogers, C. and Edelman, E. R. (1999). Endothelial implants inhibit intimal hyperplasia after porcine angioplasty. *Circ. Res.*, 84, 384-391.
215. Edelman, E. R., Nathan, A., Katada, M., Gates, J. and Karnovsky, M. J. (2000). Perivascular graft heparin delivery using biodegradable polymer wraps. *Biomaterials*, 21, 2279-2286.
216. Signore, P. E., Machan, L. S., Jackson, J. K., Burt, H., Bromley, P., Wilson, J. E. and McManus, B. M. (2001). Complete inhibition of intimal hyperplasia by perivascular delivery of paclitaxel in Balloon-injured Rat Carotid Arteries. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 12, 79-88.
217. Lovich, M. A., Brown, L. and Edelman, E. R. (1997). Drug clearance and arterial uptake after local perivascular delivery to the rat carotid artery. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29, 1645-50.
218. Nugent, H. M., Groothuis, A., Seifert, P., Guerraro, J. L., Nedelman, M., Mohanakumar, T. and Edelman, E. R. (2002). Perivascular endothelial implants inhibit intimal hyperplasia in a model of arteriovenous fistulae: a safety and efficacy study in the pig. *J. Vasc. Res.*, 39, 524-533.

219. Wong, A. H., Amabile, P. G., Yuksel, E., Waugh, J. M. and Dake, M. D. (2001). Perivascular release of insulin-like growth factor-1 limits neointima formation in the balloon-injured artery by redirecting smooth muscle cell migration. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 12, 347-350.
220. Ségot-Chicq, S., Teillaud, E. and Peppas, N. A. (1985). Les dispositifs à libération contrôlée pour la délivrance des principes actifs médicamenteux. I. Intérêt et applications. *STP Pharma*, 1, 25-36.
221. Doelker, E. (1985). Cinétique et mécanismes de la libération contrôlée à partir des systèmes polymériques. *Formes pharmaceutiques nouvelles, Techniques et Documentation* (Lavoisier), Paris, France, 65-174.
222. Peppas, N. A. (1985). Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, 60, 110-111.
223. Gander, B., Gurny, R. and Doelker, E. (1986). Matrices à libération contrôlée par le gonflement du polymère. Partie I : Mécanismes de pénétration des solvants dans les polymères. *Pharm. Acta Helv.*, 61, 130-134.
224. Thies, C. (1996). A survey of microencapsulation processes. *Microencapsulation - Methods and industrial applications*, Simon Benita, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y., USA, 1-20.
225. Giunchedi, P. and Conte, U. (1995). Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems : an overview. *S.T.P. Pharma Sciences*, 5, 276-290.
226. Büchi Laboratoriums-Technik AG. BÜCHI Mini Spray Dryer B-191. n° 95623 05 1993, A4 2000 SCH, Boîte postale CH-9230 Flawil, Suisse.
227. Büchi Laboratoriums-Technik AG. BÜCHI Mini Spray Dryer 190. n° 97021 A4 500 0786, Boîte postale CH-9230 Flawil, Suisse.
228. Perrin, D. E. and English, J. P. (1997). Polyglycolide and polylactide. *Handbook of biodegradable polymers*, vol. 7, first ed., Domb, A. J., Kost, J. and Wiseman, D. M., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 3-27.
229. Anderson, J. M. and Shive, M. S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 28, 5-24.
230. Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R. H., Verbavatz, J. M. and Langer, R. (1995). The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 16, 215-233.

231. Jelinek, Z. K. (1970). Particle size analysis. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. Halsted Press, a division of John Wiley & Sons Inc., New York, NY, U.S.A.
232. Washington, C. (1992). Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries. Ellis Horwood Series in Pharmaceutical Technology. First edition, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, England.
233. Coulter Corporation. (1995). Coulter® N4 Plus Submicron Particle Sizer - Reference manual. n° PN 4237230A (November 1995), Coulter Corporation, Miami, FL, U.S.A.
234. Bonnell, D. A. and Huey, B. D. (2001). Basic principles of scanning probe microscopy. Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy, Dawn A. Bonnell, WILEY-VCH, Inc., A John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York, NY, U.S.A., 7-42.
235. Heaton, M. G. and Serry, F. M. (2001). Scanning probe / Atomic force microscopy : Technology overview and update. ANWEB01 3/01, Digital Instrument and VEECO Metrology Group, Santa Barbara, CA, U.S.A.
236. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. and Weibel, E. (1982). Surface studies by scanning tunneling microscopy. Phys. Rev. Lett., 49, 57-61.
237. Binnig, G. and Rohrer, H. (1982). Scanning tunneling microscopy. Helv. Phys. Acta, 55, 726-735.
238. Binnig, G. and Rohrer, H. (1986). Scanning tunneling microscopy. IBM Journal of Research and Development, 30, 355-369.
239. Tersoff, J. (2001). Theory of scanning tunneling microscopy. Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy, Dawn A. Bonnell, WILEY-VCH, Inc., A John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York, NY, U.S.A., 43-57.
240. Digital Instruments. (1999). Nanoscope command reference manual. Version 4.42. Chap. I, Digital Instruments Inc, A division of Veeco Metrology Group Inc., Santa Barbara, CA, USA.
241. Howland, R. and Benatar, L. (1993-1996). A practical guide to scanning probe microscopy. Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA, U.S.A.
242. De Stefanis, A. and Tomlinson, A. A. G. (2001). Scanning Probe Microscopies. Volume 14 of Materials Science Foundations. Trans Tech Publications Inc., Enfield, New Hampshire, U.S.A.

243. Digital Instruments and Veeco Metrology Group. (2000). Scanning Probe Microscopy - Training Notebook. version 3.0 , n° 004-130-000, Digital Instruments and Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA, U.S.A.
244. Babcock, K. L. and Prater, C. B. (1995). Phase Imaging : Beyond Topography. AN11 10/95, Digital Instrument and VEECO Metrology Group, Santa Barbara, CA, U.S.A.
245. International Organization for Standardization. (1997). ISO 4287 - Geometrical Product Specifications (GPS) - Surface texture : Profile method - Terms, definitions and surface texture parameters. Genève, Switzerland.
246. Addison, P. S. (1997). Fractals and chaos. Institute of Physics Publishing, Philadelphia, PA, U.S.A.
247. Sapoval, B. (1989). Les Fractales - Fractals. Édition Diffusion Aditech, Paris, France.
248. Peitgen, H.-O., Jürgens, H. and Saupe, D. (1992). Chaos and Fractals. Springer-Verlag, New-York, NY, U.S.A.
249. Gouyet, J.-F. (1992). Physique et structures fractales. Masson Éditeur, Paris, France.
250. Tricot, C. (1999). Courbes et dimension fractale. Deuxième Édition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New-York (NY, USA) ; Paris (France).
251. Malinverno, A. (1990). A simple method To estimate The fractal dimension of self-affine series. Geophys. Res. Lett., 17, 1953-1956.
252. Kaye, B. H. (1978). Specification of the ruggedness and/or texture of a fine particle profile by its fractal dimension. Powder Technol., 21, 1-16.
253. Clark, N. N. (1986). Three techniques for implementing digital fractal analysis of particle shape. Powder Technol., 46, 45-52.
254. Tawashi, R. (1990). Particle size, shape and surface analysis of pharmaceutical powders. S.T.P. Pharma, 6, 299-302.
255. Akbarieh, M. and Tawashi, R. (1989). Surface studies of calcium oxalate dihydrate single crystals during dissolution in the presence of stone-formers urine. Scanning Microsc., 3, 139-146.
256. Ramadan, M. A. and Tawashi, R. (1990). Effect of surface geometry and morphic features on the flow characteristics of microspheres suspensions. J. Pharm. Sci., 79, 929-933.

257. El-Arini, S. K., Thibert, R. and Tawashi, R. (1993). Use of fractal dimension in the study of fractured surfaces of insulin zinc crystals. *J. Pharm. Sci.*, 82, 844-846.
258. Thibert, R., Akbarieh, M. and Tawashi, R. (1988). Application of fractal dimension to the study of the surface ruggedness of granular solids and excipients. *J. Pharm. Sci.*, 77, 724-726.
259. Pimienta, C., Dubuc, B. and Tawashi, R. (1994). Surface fractal dimension and the quantification of roughness of titanium implant material. *Cells and Materials*, 4, 379-386.
260. Thibert, R., Dubuc, B., Dufour, M. and Tawashi, R. (1993). Evaluation of the surface roughness of cystine stones using a visible laser diode scattering approach. *Scanning Microsc.*, 7, 555-561.
261. Simpson, G. J., Sedin, D. L. and Rowlen, K. L. (1999). Surface roughness by contact versus tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir*, 15, 1429-1434.
262. Li, T. and Park, K. (1998). Fractal analysis of pharmaceutical particles by atomic force microscopy. *Pharm. Res.*, 15, 1222-1232.
263. Prud'homme, J. and Prud'homme, R. (1981). *Synthèse et caractérisation des macromolécules*. Les Presses de l'Université de Montréal., Montréal, Qué., Canada.
264. Fontanille, M. and Gnanou, Y. (2002). *Chimie et physico-chimie des polymères*. Première édition, édition Dunod, Paris, France.
265. Grynberg, G., Aspect, A. and Fabre, C. (1997). *Introduction aux lasers et à l'optique quantique*. Édition Ellipses, Paris, France.
266. Fadini, A. and Schnepel, F.-M. (1989). *Vibrational spectroscopy*. Ellis Horwood Series : in Analytical chemistry. First edition, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, England.
267. Daune, M. (1993). *Biophysique moléculaire*. InterÉditions, Paris, France.
268. Schrader, B. and Moore, D. S. (1997). Nomenclature, Symbols, Units and their usage in spectrochemical analysis .Part 18. Laser-based molecular spectroscopy for chemical analysis : Raman scattering processes. *Pure Appl. Chem.*, 69, 1451-1468.
269. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (1994). Second edition. Edited by Wade, A. and Weller, P. J. Published by the American Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Washington, USA.

270. McCreery, R. L. (2000). Raman spectroscopy for chemical analysis. 157, Wiley-Interscience, a John Wiley, Inc. Publication, Toronto, Canada.
271. Robinson, J. F. and Robinson, K. A. (1998). Contemporary chemical analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
272. Laporte, S. and Escher, E. (1992). Neointima formation after vascular injury is angiotensin II mediated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 1510-1516.
273. Neter, J., Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models. Fourth Edition, WCB - Irwin McGraw-Hill, Boston, MA, U.S.A.
274. Magonov, S. N. (2000). Atomic force microscopy in analysis of polymers. *Encyclopedia of analytical chemistry*, vol. 8, Meyer, R. A. and RAMTECH Ltd (Tarzana, C., USA), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, United Kingdom, 7432-7491.
275. Painter, P. C. and Coleman, M. M. (1997). Fundamentals of Polymer Science. Second Edition, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, PA, U.S.A.
276. Mathot, V. (1994). Calorimetry and thermal analysis of polymers. Hanser/Gardner Publications Inc., Cincinnati, Ohio, USA.
277. Groenewoud, W. M. (2001). Characterisation of polymers by thermal analysis. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.
278. Scherrer, B. (1984). Biostatistique. Gaëtan Morin Éditeur, Chicoutimi, Québec, Canada.
279. Zar, J. H. (1996). Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, N. J., USA.
280. Frontier, S., Davoult, D., Gentilhomme, V. and Lagadeuc, Y. (2001). Statistique pour les sciences de la vie et de l'environnement. Dunod, Paris, France.
281. Valleron, A.-J. (1998). Introduction à la biostatistique. Évaluation et statistique. Masson, Paris, France.

VII ANNEXES

VII - 1 ANNEXE A

ANNEXE VII-A Démonstration de la formule de l'écart type en fonction de la masse moléculaire en nombre et la masse moléculaire en poids

Soit la fonction de distribution de la masse moléculaire en nombre :

$$\int_0^{\infty} f_n (M) \, d M$$

Soit la fonction de distribution de masse moléculaire en poids :

$$\int_0^{\infty} f_w (M) \, d M$$

La fraction en nombre des molécules de masse moléculaire, comprise entre M et $M + dM$ est alors :

$$\frac{f_n (M) \, d M}{\int_0^{\infty} f_n (M) \, d M}$$

La fraction en poids des molécules de masse moléculaire, comprise entre M et $M + dM$, est alors :

$$\frac{f_w (M) \, d M}{\int_0^{\infty} f_w (M) \, d M}$$

Dans des conditions de normalisation, la fonction de distribution de la masse moléculaire en nombre, normalisée pourrait être notée ainsi :

$$\int_0^{\infty} f_n (M) \, d M = 1$$

Dans des conditions de normalisation, la fonction de distribution de masse moléculaire en poids, normalisée pourrait être notée ainsi :

$$\int_0^{\infty} f_w (M) \, d M = 1$$

Une relation existe entre les deux fonctions de distribution de masse moléculaire, en poids et en nombre, de telle manière à ce que :

$$f_w(M) = M \cdot f_n(M)$$

La masse moléculaire moyenne en nombre peut alors être exprimée de cette façon :

$$\overline{M}_n = \frac{\int_0^{\infty} M \cdot f_n(M) dM}{\int_0^{\infty} f_n(M) dM}$$

La masse moléculaire moyenne en poids peut aussi être exprimée d'une façon analogue :

$$\overline{M}_w = \frac{\int_0^{\infty} M \cdot f_w(M) dM}{\int_0^{\infty} f_w(M) dM}$$

La variance, σ_n^2 , de la fonction de distribution $f_n(M)$ est :

$$\sigma_n^2 = \frac{\int_0^{\infty} (M - \overline{M}_n)^2 f_n(M) dM}{\int_0^{\infty} f_n(M) dM}$$

La variance, σ_w^2 , de la fonction de distribution $f_w(M)$ est :

$$\sigma_w^2 = \frac{\int_0^{\infty} (M - \overline{M}_w)^2 f_w(M) dM}{\int_0^{\infty} f_w(M) dM}$$

Cependant puisque l'aspect « nombre » des masses moléculaires est important dans cette démarche, l'effort est alors entrepris sur la variance σ_n^2 :

$$\sigma_n^2 = \frac{\int_0^\infty (M^2 - 2 \cdot M \cdot \overline{M}_n + \overline{M}_n^2) \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM}$$

autrement dit :

$$\sigma_n^2 = \frac{\int_0^\infty M^2 \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM} - 2 \cdot \overline{M}_n \cdot \frac{\int_0^\infty M \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM} - \overline{M}_n^2 \cdot \frac{\int_0^\infty f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM}$$

Le premier terme est :

$$\frac{\int_0^\infty M^2 \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM} = \frac{\int_0^\infty M^2 \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty M \cdot f_n(M) dM} \times \frac{\int_0^\infty M \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM}$$

$$\frac{\int_0^\infty M^2 \cdot f_n(M) dM}{\int_0^\infty f_n(M) dM} = \overline{M}_w \cdot \overline{M}_n$$

Finalement après simplification, la variance σ_n^2 est :

$$\sigma_n^2 = \overline{M}_w \cdot \overline{M}_n - \overline{M}_n^2$$

$$\sigma_n^2 = \overline{M}_n^2 \left(\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} - 1 \right)$$

L'écart type est facilement déduit :

$$\sigma_n = \sqrt{\sigma_n^2} = \sqrt{\overline{M}_n^2 \left(\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} - 1 \right)}$$

VII - 2 ANNEXE B

ANNEXE VII-B Rappel de notions statistiques

Pour aborder les théories, concepts et définitions sur les tests statistiques, il est vivement conseillé de se référer aux auteurs suivants : Neter et coll. (1996)^[273], Scherrer (1984)^[278], Zar (1996)^[279], Frontier et coll. (2001)^[280]. D'une façon générale, il existe plusieurs tests de comparaisons multiples comme par exemple : Le test L.S.D (*Least Significant Difference*), le test de Duncan (*Duncan's multiple range test*), le test S.N.K. (méthode de *Student-Newman-Keuls*), le test H.S.D de Tukey (*Honestly Significant Difference*), le test de Scheffé, le test de Bonferroni ainsi que les variantes de beaucoup de ces tests. Il est parfois de difficile de considérer qu'un test est plus approprié qu'un autre. Concrètement, les tests de comparaisons multiples diffèrent par la définition de l'erreur de type I ou risque α , qui consiste à rejeter à tort l'hypothèse nulle.

En fait, il est possible de concevoir cette erreur α sous deux angles :

- d'une part comme la probabilité α_1 de rejeter à tort l'hypothèse nulle (c'est à dire d'égalité entre deux moyennes). Dans ce cas, le raisonnement s'applique sur chaque couple de moyenne de manière individuelle. Dans cette situation, les petites différences entre les moyennes peuvent être décelées mais il y a le risque de déclarer trop de différences significatives.
- ou d'autre part comme la probabilité α_2 de rejeter au moins une fois à tort l'hypothèse nulle au cours de la série d'expérience qui a généré les moyennes distinctes pour les groupes. Dans ce cas, le raisonnement s'applique plutôt globalement à l'ensemble de l'expérience, selon le concept de l'approche ANOVA. Dans cette situation, les trop petites différences entre les moyennes ne sont pas décelées. Par conséquent pour un risque α fixé, il sera d'autant plus difficile de

rejeter l'hypothèse nulle, ou d'égalité entre deux moyennes, que le nombre de comparaisons est grand.

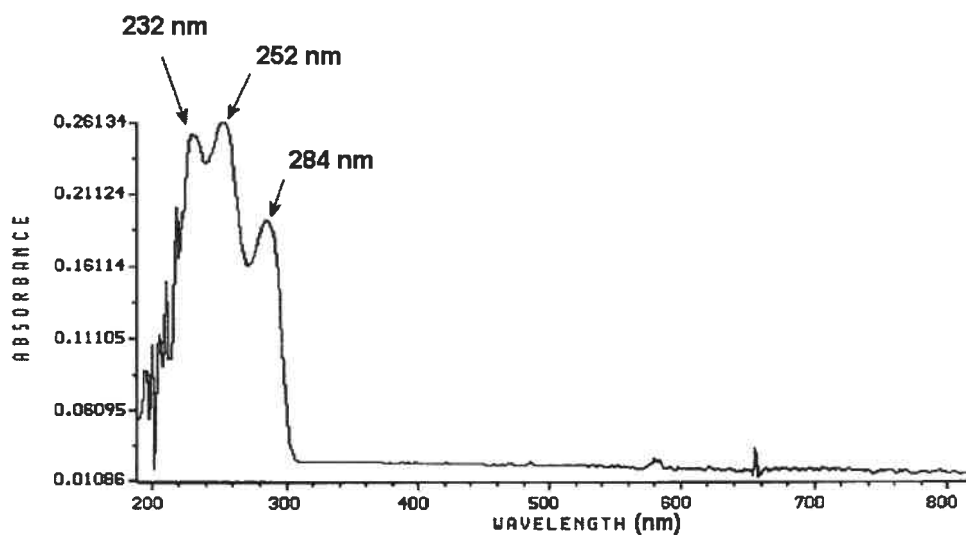
Par exemple, le test de Tukey et le test de Scheffé utilisent l'approche α_2 . De plus, ces deux tests seraient plus sensibles que le test de Bonferroni. En effet, le test de Bonferroni, bien que souvent appliqué serait le moins exact des trois tests car la correction de Bonferroni consiste à effectuer les tests de comparaison de moyennes en rejetant l'hypothèse nulle d'égalité entre deux moyennes, pour un critère de comparaison donné, correspondant non plus à un risque α (par exemple 5 %) fixé mais à $\frac{\alpha}{k}$ où k est le nombre de groupes ^[281]. La correction de Bonferroni est trop exigeante au point de ne pas découvrir des différences qui pourraient être mises en évidence par une méthode plus sensible.

Dans le cadre de cette recherche, il a été décidé d'utiliser le test de Scheffé.

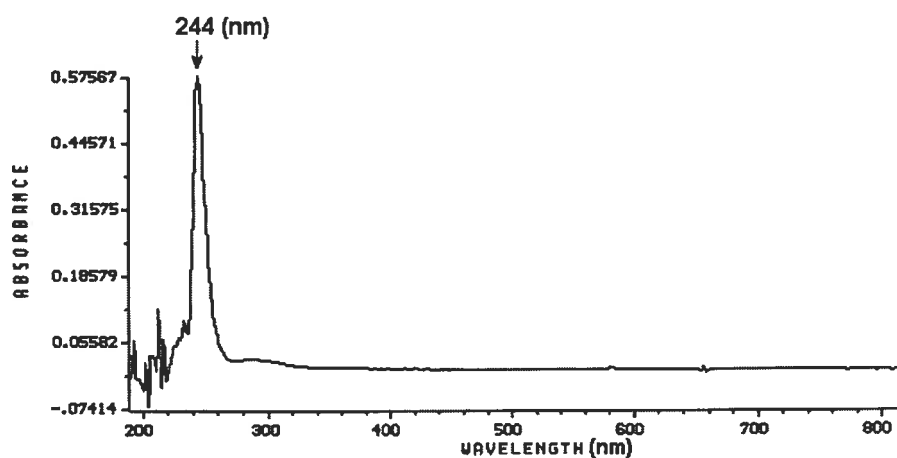
VII - 3 ANNEXE C

ANNEXE VII-C Spectres d'absorption du L-158,809 et du Captopril dans le THF par spectrophotométrie UV-Visible

VII - 3.1 Spectre d'absorption du L-158,809 dans le THF



VII - 3.2 Spectre d'absorption du Captopril dans le THF



VII - 4 ANNEXE D

ANNEXE VII-D Tailles moyennes des microsphères de différents PLA ou mélanges de PLA, à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, avec ou sans PEG-1540 distéarate, déterminées à différents angles, par spectroscopie de corrélation de photons

VII - 4.1 Tailles moyennes des microsphères de PLA (49 898 PM) à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, déterminées à différents angles

Taille moyenne (nm) \pm écart type moyen							
Médicament	Teneur	Angles (degré)					
		11.1	15.7	23	30.1	62.6	90
L-158,80	5 %	138.6 \pm 96.3	1154.4 \pm 372.4	2990.8 \pm 1348.2	4370.6 \pm 1476.4	5773.2 \pm 3512.8	6933.5 \pm 3439.0
	10 %	209.6 \pm 87.5	1163.0 \pm 380.0	2900.1 \pm 650.8	4283.7 \pm 1769.4	2857.2 \pm 1286.1	5304.2 \pm 3754.7
	20 %	198.8 \pm 61.9	381.3 \pm 130.3	1063.6 \pm 255.8	3287.5 \pm 1629.8	4480.9 \pm 3691.6	5494.8 \pm 3716.6
	35 %	348.0 \pm 99.1	948.8 \pm 168.7	1891.7 \pm 455.5	1537.9 \pm 522.9	9784.7 \pm 1687.1	6539.5 \pm 3649.5
Captopril	5 %	306.6 \pm 94.8	1360.3 \pm 288.5	3816.4 \pm 349.5	9291.6 \pm 3003.4	9786.6 \pm 906.1	10 000.0 \pm 906.1
	10 %	499.2 \pm 100.7	1251.3 \pm 241.3	3637.1 \pm 512.2	4877.7 \pm 1235.1	6206.1 \pm 3362.2	5173.8 \pm 3315.6
	20 %	270.0 \pm 48.8	740.5 \pm 121.2	3765.3 \pm 1193.6	5003.8 \pm 803.2	10 000.0 \pm 906.1	10 000.0 \pm 906.1
	35 %	308.7 \pm 277.7	608.6 \pm 99.3	2617.5 \pm 460.7	5698.0 \pm 953.9	8799.0 \pm 1755.8	10 000.0 \pm 906.1

VII - 4.2 Tailles moyennes des microsphères de PLA (49 898 PM) avec PEG 1540 distéarate, à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, déterminées à différents angles

Taille moyenne (nm) \pm écart type moyen							
Médicament	Teneur	Angles (degré)					
		11.1	15.7	23	30.1	62.6	90
L-158,80	3.84 %	230.3 \pm 82.3	1184.2 \pm 397.0	2691.5 \pm 786.8	3004.9 \pm 527.3	3206.3 \pm 460.9	3053.7 \pm 460.9
	7.40 %	279.6 \pm 73.3	933.8 \pm 188.2	2574.0 \pm 821.0	3882.6 \pm 1343.8	9355.8 \pm 1860.7	9827.7 \pm 1457.4
	10.71 %	262.6 \pm 157.3	1128.2 \pm 346.4	4072.4 \pm 1425.7	6907.8 \pm 2964.5	7610.7 \pm 3079.1	6089.7 \pm 3756.7
	13.74 %	269.9 \pm 78.4	5559.1 \pm 5640.1	4484.9 \pm 4067.6	8562.0 \pm 2466.8	9988.6 \pm 1457.4	10 000.0 \pm 1457.4
Captopril	7.40 %	106.3 \pm 18.2	623.0 \pm 108.4	3855.6 \pm 2365.7	1905.2 \pm 355.6	9860.7 \pm 1365.2	9920.9 \pm 906.1
	13.79 %	260.9 \pm 51.0	563.3 \pm 52.0	5363.1 \pm 1342.7	9793.5 \pm 1682.9	4841.6 \pm 3400.9	7915.7 \pm 1382.4

VII - 4.3 Tailles moyennes des microsphères de PLA (95 248 PM) avec PEG 1540 distéarate, à des teneurs croissantes de L-158,809 ou de Captopril, déterminées à différents angles

Taille moyenne (nm) \pm écart type moyen							
Médicament	Teneur	Angles (degré)					
		11.1	15.7	23	30.1	62.6	90
L-158,80	10%	390.7 \pm 93.1	2957.0 \pm 4555.0	2456.4 \pm 456.8	2409.1 \pm 503.9	3686.3 \pm 479.7	5936.2 \pm 3101.7
	20%	672.3 \pm 128.3	4266.1 \pm 4713.7	3156.5 \pm 1013.3	4301.5 \pm 891.8	5411.4 \pm 3250.5	6160.6 \pm 3414.1
	30%	286.7 \pm 40.3	1557.5 \pm 221.5	3547.0 \pm 682.5	6041.4 \pm 1604.0	9995.7 \pm 906.1	5134.2 \pm 3356.0
	40%	286.0 \pm 40.9	926.2 \pm 178.9	2376.0 \pm 454.5	3821.4 \pm 349.5	5343.8 \pm 2931.9	5684.9 \pm 3172.5
Captopril	10%	211.2 \pm 26.9	702.4 \pm 127.1	3755.1 \pm 3492.5	3918.5 \pm 350.8	6498.2 \pm 3030.4	6672.4 \pm 3075.6
	20%	500.9 \pm 115.0	2437.5 \pm 979.2	9214.9 \pm 3156.2	1983.8 \pm 206.3	10 000.0 \pm 906.1	7089.1 \pm 699.8
	30%	274.2 \pm 47.6	2917.4 \pm 3201.3	1674.2 \pm 447.9	3439.6 \pm 624.7	9126.1 \pm 1524.6	1505.7 \pm 994.0
	40%	389.5 \pm 389.1	2172.7 \pm 1237.3	3598.7 \pm 856.0	7284.6 \pm 3784.6	4956.9 \pm 3328.9	7412.0 \pm 704.1

VII - 4.4 Tailles moyennes des microsphères de différents PLA, avec ou sans PEG 1540 distéarate, déterminées à différents angles

Taille moyenne (nm) \pm écart type moyen						
Constituants des microsphères	Angles (degré)					
	11.1	15.7	23	30.1	62.6	90
PLA (49 898 PM)	155.1 ± 17.9	710.5 ± 144.2	2025.8 ± 185.2	3033.2 ± 1598.1	3886.9 ± 2527.5	3940.8 ± 2669.8
PLA (49 898 PM) et PEG-1540 distéarate	309.3 ± 273.1	573.5 ± 91.1	1944.8 ± 267.4	2009.7 ± 185.2	9979.2 ± 544.6	4360.4 ± 1933.4
PLA (95 248 PM)	469.9 ± 88.5	1086.7 \pm 142.5	3196.2 ± 1129.2	2376.3 ± 544.8	5888.3 ± 3933.7	3072.3 ± 1458.3
PLA (95 248 PM) et PEG-1540 distéarate	338.3 ± 310.5	416.0 ± 37.8	2236.2 ± 404.4	2477.3 ± 712.3	1112.2 ± 817.2	1499.2 ± 1450.4
PLA (73 405 PM) versus PLA (15 075 PM) : ratios 50 / 50	177.9 ± 33.5	673.9 ± 128.4	1255.2 ± 240.2	2280.0 ± 423.9	8885.0 ± 1658.3	8073.8 ± 2337.1
PLA (73 405 PM) versus PLA (15 075 PM) : ratios 60 / 40	140.8 ± 26.5	717.0 ± 121.1	1828.2 ± 392.7	2578.7 ± 602.2	8925.4 ± 1601.3	6860.8 ± 2854.5

VII - 4.5 Tailles moyennes de deux formulations de microsphères d'un mélange de PLA (73 405 PM) et PLA (15 075 PM), avec PEG 1540 distéarate, à des teneurs croissantes de L-158,809, déterminées à différents angles

Taille moyenne (nm) \pm écart type moyen							
Ratio PLA (73 405 PM) versus PLA (15 075 PM)	Teneur en médicament	Angles (degré)					
		11.1	15.7	23	30.1	62.6	90
50/50	10%	201.1 \pm 38.5	933.8 \pm 176.7	4876.3 \pm 1330.3	2633.7 \pm 606.3	8654.0 \pm 2370.6	9954.0 \pm 625.8
	20%	186.5 \pm 113.1	499.8 \pm 97.8	2168.5 \pm 339.2	3766.6 \pm 352.7	8429.7 \pm 1704.6	8058.3 \pm 2649.5
	30%	93.3 \pm 17.2	497.0 \pm 93.6	1368.9 \pm 262.5	2689.7 \pm 330.7	4415.1 \pm 862.4	6038.8 \pm 2519.3
60/40	10%	328.3 \pm 56.0	416.3 \pm 37.8	3223.6 \pm 672.8	3623.5 \pm 735.2	10 000.0 \pm 906.1	5861.3 \pm 3133.3
	20%	359.7 \pm 68.2	998.2 \pm 159.8	3031.8 \pm 516.5	5079.4 \pm 620.9	9783.3 \pm 906.1	6089.7 \pm 3051.8

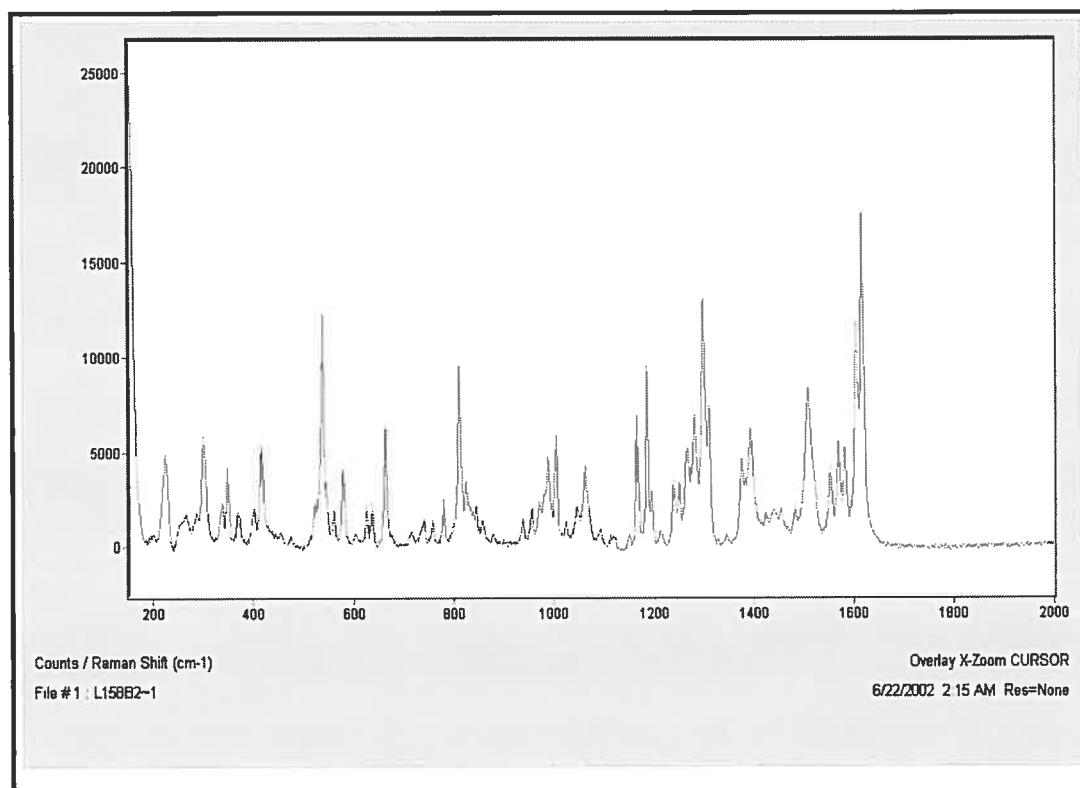
VII - 4.6 Tailles moyennes des microsphères de PLA (66 285 PM), avec 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril, déterminées à différents angles

Taille moyenne (nm) \pm écart type moyen						
Teneur en médicament	Angles (degré)					
	11.1	15.7	23	30.1	62.6	90
20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril	299.1 \pm 27.5	818.1 \pm 107.0	3197.6 \pm 684.7	6353.0 \pm 1210.7	9369.4 \pm 2524.2	9544.2 \pm 2441.6

VII - 5 ANNEXE E

ANNEXE VII-E Spectre Raman des principes actifs utilisés, L-158,809, Captopril et Dexaméthasone

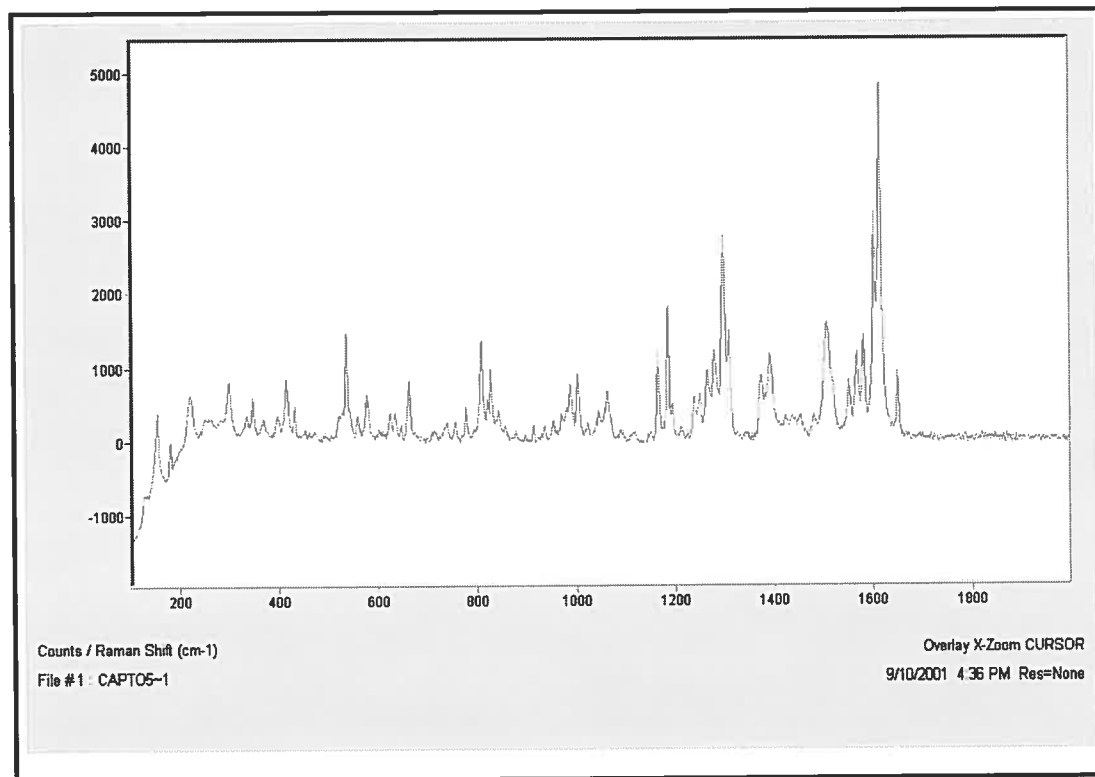
VII - 5.1 Spectre Raman du L-158,809 et ses principaux pics



Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
1616	17637
1507	8321
1393	6295
1299	12995
1187	9546
1167	6912
1064	4367
1006	5902
990	4718

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
810	9459
664	6474
580	4147
538	12228
417	5286
349	4122
302	5825
224	4985

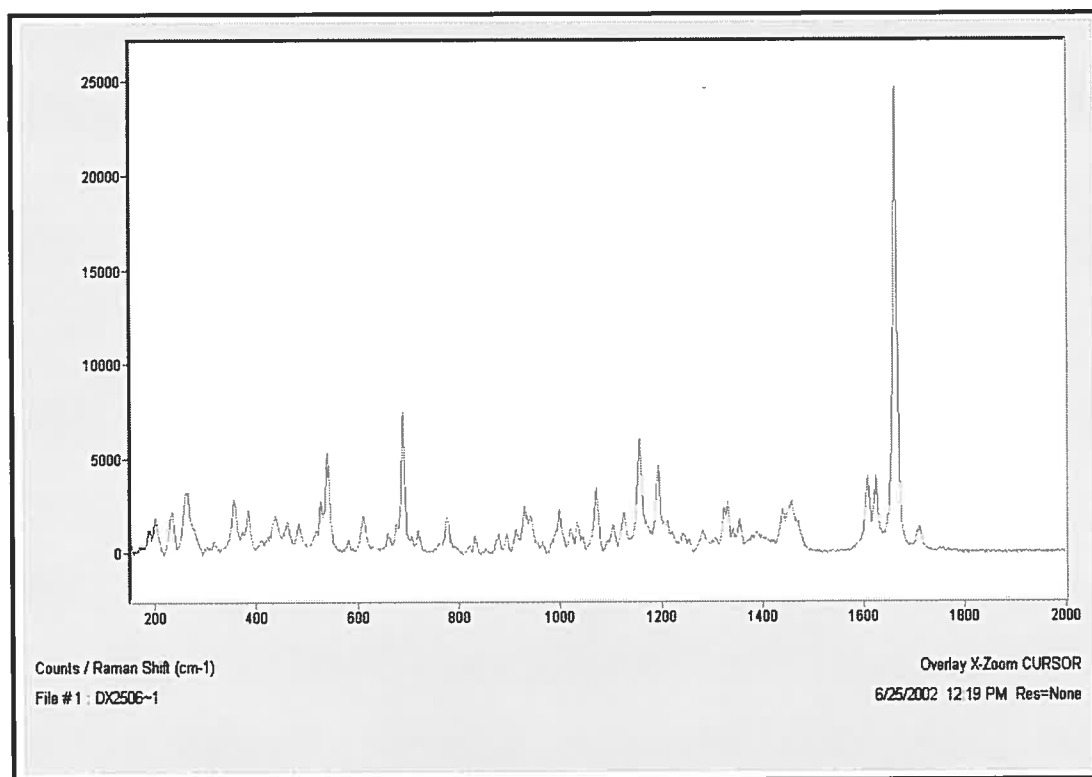
VII - 5.2 Spectre Raman du Captopril et ses principaux pics



Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
1615	4807
1507	1595
1391	1175
1298	2756
1186	1802
1166	1208
1063	698
1004	932
989	798

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
829	985
810	1358
663	817
579	636
537	1470
417	837
301	662
224	665
158	1015

VII - 5.3 Spectre Raman du Dexamethasone et ses principaux pics



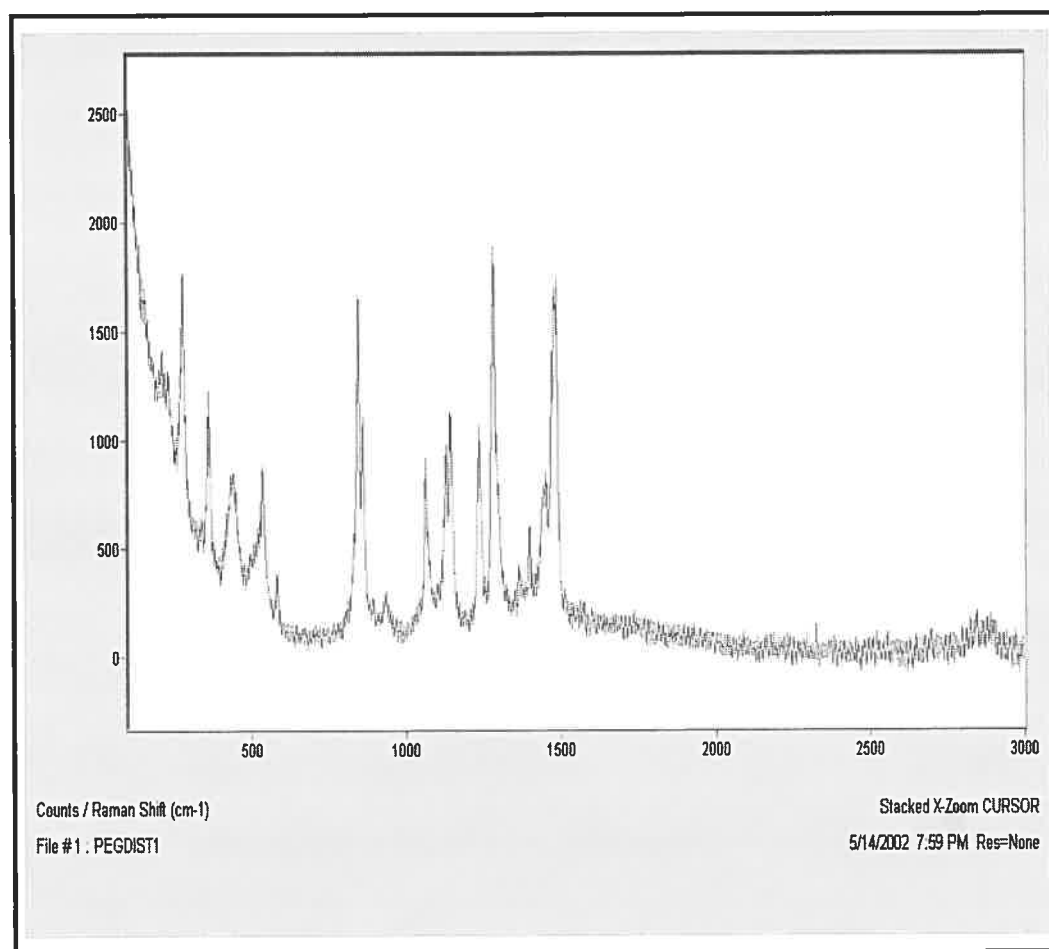
Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
1662	24709
1624	3951
1607	3951
1458	2701
1355	1690
1194	4539
1158	5976
1072	3371
999	2203

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
931	2471
778	1789
690	7266
612	1843
540	5140
385	2112
358	2695
264	4086
236	3457

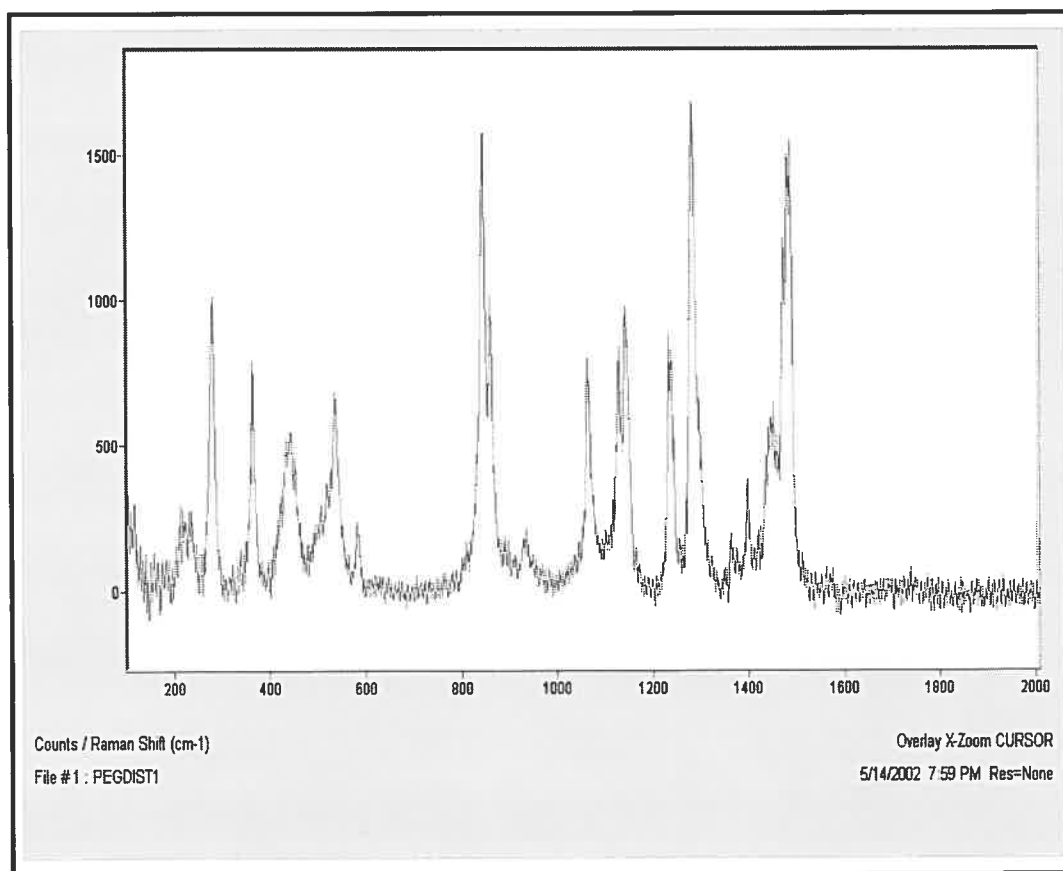
VII - 6 ANNEXE F

ANNEXE VII-F Spectre Raman des excipients utilisés, PEG-1540 distéarate, microsphères de PLA 49 898 PM et microsphères de PLGA 48 000 PM

VII - 6.1 Spectre Raman du PEG-1540 distéarate sans retrait de la fluorescence

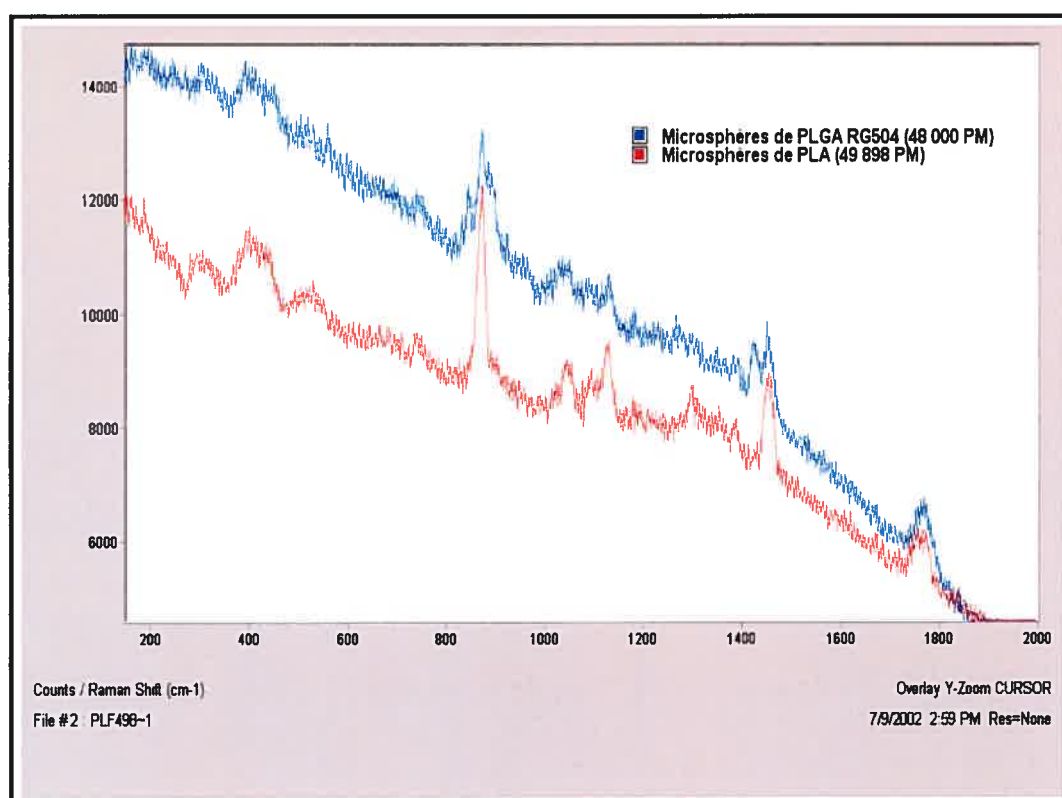


VII - 6.2 Spectre Raman du PEG-1540 distéarate avec retrait de la fluorescence

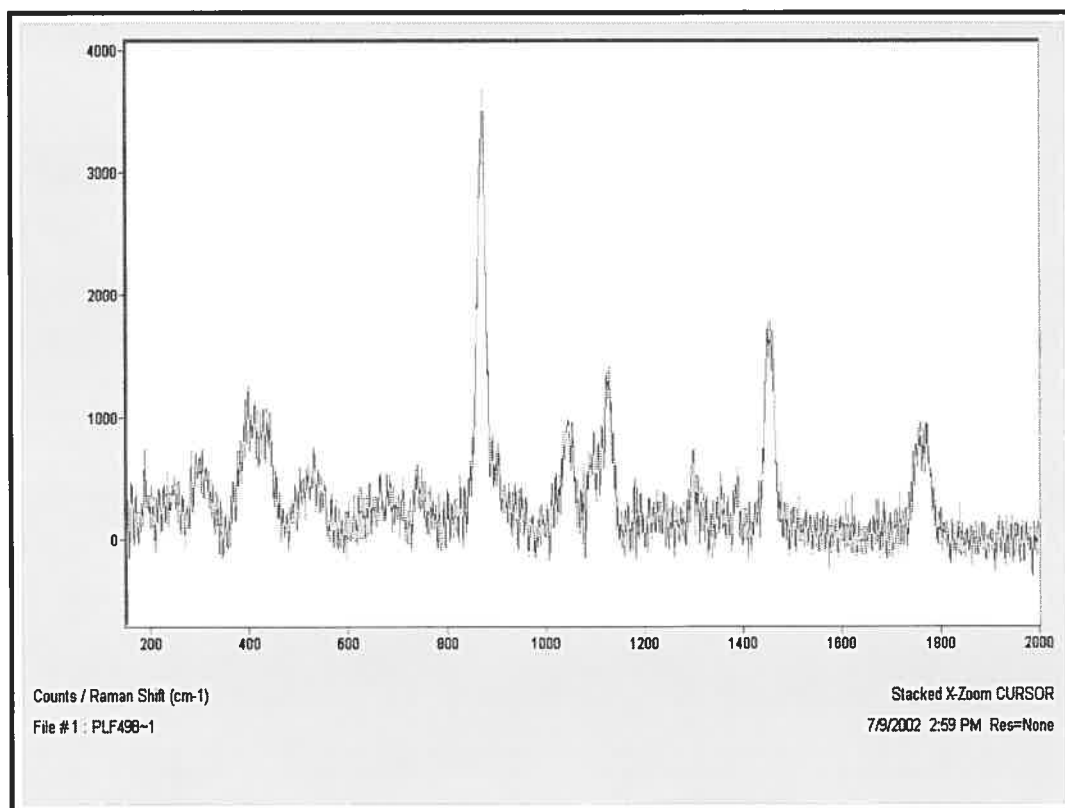


Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
1482	1494
1283	1684
1236	868
1144	977
1067	787
846	1576
538	676
441	524
365	780
281	967

VII - 6.3 Spectres Raman des microsphères de PLA 49 898 PM et des microsphères de PLGA 48 000 PM, sans retrait de la fluorescence

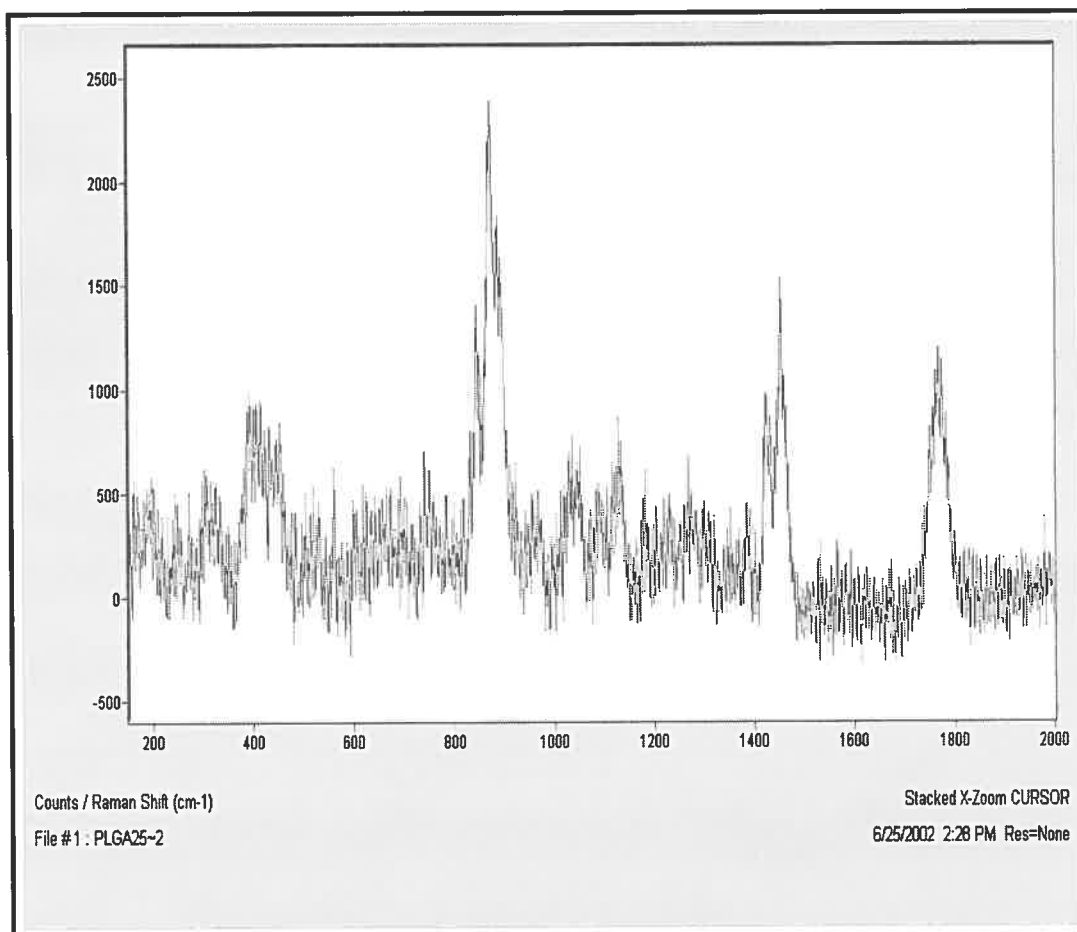


VII - 6.4 Spectre Raman des microsphères de PLA 49 898 PM avec retrait de la fluorescence



Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
1767	727
1456	1557
1390	461
1300	777
1130	1241
1096	826
1047	826
875	3454
404	915

VII - 6.5 Spectre Raman des microsphères de PLGA 48 000 PM avec retrait de la fluorescence



Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité (coups)
1770	1088
1454	1443
1426	978
1130	514
1041	653
874	2178

VII - 7 ANNEXE G

ANNEXE VII-G Résultats des tests de comparaisons multiples par le test de Sheffé dans les dépôts périvasculaires de microsphères de PLA 50-50, avec L-158,809

VII - 7.1 Comparaisons multiples des moyennes des surfaces luminales normalisées par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence significative au seuil de risque de 5 %
			Limite inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_A 0 % de L-158,809	0.43754				
versus B_A	0.45845	-0.02091	-0.17878	0.13696	Non
versus C_A	0.60715	-0.16961	-0.33367	-0.00554	Oui
versus D	0.39399	0.04355	-0.12052	0.20761	Non
versus E	0.72768	-0.29013	-0.448	-0.13226	Oui
Groupe B_A 10 % de L-158,809	0.45845				
versus C_A	0.60715	-0.1487	-0.29679	-6.01469E-4	Oui
versus D	0.39399	0.06446	-0.08364	0.21255	Non
versus E	0.72768	-0.26922	-0.41043	-0.12802	Oui
Groupe C_A 20 % de L-158,809	0.60715				
versus D	0.39399	0.21316	0.05847	0.36784	Oui
versus E	0.72768	-0.12052	-0.26862	0.02757	Non
Groupe D angioplastie et sans traitement	0.39399				
versus E sans angioplastie et sans traitement	0.72768	-0.33368	-0.48178	-0.18558	Oui

VII - 7.2 Comparaisons multiples des moyennes des proliférations néo-intimales normalisées par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différence s entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence significative au seuil de risque de 5 %
			Limite inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_A 0 % de L-158,809	0.81945				
versus B_A	0.75148	0.06798	-0.53832	0.67427	Non
versus C_A	0.13972	0.67974	0.04966	1.30982	Oui
versus D	0.9638	-0.14434	-0.77443	0.48574	Non
versus E	-1	1.81945	1.21316	2.42575	Oui
Groupe B_A 10 % de L-158,809	0.75148				
versus C_A	0.13972	0.61176	0.04301	1.18052	Oui
versus D	0.9638	-0.21232	-0.78108	0.35644	Non
versus E	-1	1.75148	1.20919	2.29377	Oui
Groupe C_A 20 % de L-158,809	0.13972				
versus D	0.9638	-0.82408	-1.41813	-0.23003	Oui
versus E	-1	1.13972	0.57096	1.70847	Oui
Groupe D angioplastie et sans traitement	0.9638				
versus E sans angioplastie et sans traitement	-1	1.9638	1.39504	2.53255	Oui

VII - 7.3 Comparaisons multiples des moyennes des rapports des surfaces normalisées des intimas (I) sur les médias (M) par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence Significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_A 0 % de L-158,809	1.51413				
versus B_A	1.28294	0.23119	-0.46938	0.93176	Non
versus C_A	0.98112	0.53301	-0.19505	1.26106	Non
versus D	1.31894	0.19519	-0.53286	0.92325	Non
versus E	0	1.51413	0.81356	2.2147	Oui
Groupe B_A 10 % de L-158,809	1.28294				
versus C_A	0.98112	0.30181	-0.35538	0.95901	Non
versus D	1.31894	-0.036	-0.69319	0.62119	Non
versus E	0	1.28294	0.65633	1.90955	Oui
Groupe C_A 20 % de L-158,809	0.98112				
versus D	1.31894	-0.33781	-1.02423	0.3486	Non
versus E	0	0.98112	0.32393	1.63832	Oui
Groupe D angioplastie et sans traitement	1.31894				
versus E sans angioplastie et sans traitement	0	1.31894	0.66174	1.97613	Oui

VII - 8 ANNEXE H

ANNEXE VII-H Résultats des tests de comparaisons multiples par le test de Sheffé dans les dépôts périvasculaires de microsphères de PLA 60-40, avec L-158,809

VII - 8.1 Comparaisons multiples des moyennes des surfaces luminales normalisées par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence Significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_B 0 % de L-158,809	0.35996				
versus B_B	0.55062	-0.19066	-0.34025	-0.04107	Oui
versus C_B	0.50741	-0.14745	-0.29067	-0.00423	Oui
versus D	0.39399	-0.03404	-0.18362	0.11555	Non
Groupe B_B 10 % de L-158,809	0.55062				
versus C_B	0.50741	0.04321	-0.10001	0.18643	Non
versus D	0.39399	0.15662	0.00704	0.30621	Oui
Groupe C_B 20 % de L-158,809	0.50741				
versus D Angioplastie et Sans traitement	0.39399	0.11342	-0.0298	0.25663	Non

VII - 8.2 Comparaisons multiples des moyennes des proliférations néointimales normalisées par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence Significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_B 0 % de L-158,809	1.52498				
versus B_B	0.44865	1.07633	-0.17986	2.33252	Non
versus C_B	0.44468	1.0803	-0.12241	2.28302	Non
versus D	0.9638	0.56118	-0.69501	1.81737	Non
Groupe B_B 10 % de L-158,809	0.44865				
versus C_B	0.44468	0.00397	-1.19874	1.20669	Non
versus D	0.9638	-0.51515	-1.77134	0.74104	Non
Groupe C_B 20 % de L-158,809	0.44468				
versus D Angioplastie et Sans traitement	0.9638	-0.51912	-1.72184	0.68359	Non

VII - 8.3 Comparaisons multiples des moyennes des rapports des surfaces normalisées des intimas (I) sur les médias (M) par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_B 0 % de L-158,809	1.69327				
versus B_B	1.02486	0.66841	-0.2202	1.55703	Non
versus C_B	1.13633	0.55694	-0.29385	1.40773	Non
versus D	1.31894	0.37434	-0.51428	1.26295	Non
Groupe B_B 10 % de L-158,809	1.02486				
versus C_B	1.13633	-0.11147	-0.96226	0.73931	Non
versus D	1.31894	-0.29408	-1.1827	0.59454	Non
Groupe C_B 20 % de L-158,809	1.13633				
versus D angioplastie et sans traitement	1.31894	-0.18261	-1.03339	0.66818	Non

VII - 9 ANNEXE I

ANNEXE VII-I Résultats des tests de comparaisons multiples par le test de Sheffé des moyennes dans les dépôts périvasculaires de microsphères de PLA avec L-158,809 et Captopril : Expérience de bi-médication

VII - 9.1 Comparaisons multiples des moyennes des surfaces luminales normalisées par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence Significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_C 20 % de L-158,809	0.66879				
versus B_C	0.50335	0.16545	0.04106	0.28984	Oui
versus C_C	0.69858	-0.02979	-0.15971	0.10013	Non
versus D	0.39399	0.2748	0.14488	0.40472	Oui
Groupe B_C 20 % de L-158,809	0.50335				
versus C_C	0.69858	-0.19524	-0.31963	-0.07085	Oui
versus D	0.39399	0.10935	-0.01504	0.23374	Non
Groupe C_C 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril	0.69858				
versus D Angioplastie et Sans traitement	0.39399	0.30459	0.17467	0.43451	Oui

VII - 9.2 Comparaisons multiples des moyennes des proliférations néointimales normalisées par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence Significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_C 20 % de L-158,809	0.08865				
versus B_C	0.49449	-0.40585	-1.02646	0.21477	Non
versus C_C	-0.08229	0.17093	-0.47728	0.81915	Non
versus D	0.9638	-0.87515	-1.52336	-0.22694	Oui
Groupe B_C 20 % de L-158,809	0.49449				
versus C_C	-0.08229	0.57678	-0.04384	1.1974	Non
versus D	0.9638	-0.46931	-1.08992	0.15131	Non
Groupe C_C 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril	-0.08229				
versus D Angioplastie et Sans traitement	0.9638	-1.04609	-1.6943	-0.39787	Oui

VII - 9.3 Comparaisons multiples des moyennes des rapports des surfaces normalisées des intimas (I) sur les médias (M) par le test de Scheffé

Groupe	Moyenne	Différences entre les moyennes	Intervalles de confiance simultanés		Différence Significative à 0.05
			Limite Inférieure	Limite supérieure	
Groupe A_C 20 % de L-158,809	0.51324				
versus B_C	0.88981	-0.37658	-0.97695	0.22379	Non
versus C_C	0.33454	0.1787	-0.44837	0.80576	Non
versus D	1.31894	-0.8057	1.43277	-0.17864	Oui
Groupe B_C 20 % de L-158,809	0.88981				
versus C_C	0.33454	0.55527	-0.0451	1.15564	Non
versus D	1.31894	-0.42912	-1.0295	0.17125	Non
Groupe C_C 20 % de L-158,809 et 20 % de Captopril	0.33454				
versus D angioplastie et sans traitement	1.31894	-0.9844	-1.61146	-0.35733	Oui